

00001

② 23

1978 DE MAYO 1978  
MEXICO 17 DE MAYO

REGULACION COORDINADA DE LA ASIMILACION DE AMONIO Y DEL METABOLISMO DE CARBONO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis que para obtener el grado de Dr. en Investigación Biomédica Basica presenta.

María Alicia González Manjarrez  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del  
C.C.H.  
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

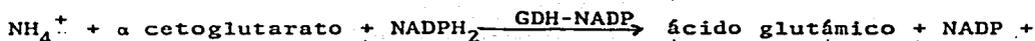
## INTRODUCCION.

El nitrógeno es un elemento que forma parte de muchos compuestos simples y de casi todas las macromoléculas complejas de los seres vivos; especialmente de las proteínas y los ácidos nucleicos. Los microorganismos pueden utilizar una gran variedad de moléculas ni trogenadas como únicas fuentes de nitrógeno celular. El amonio, el ácido glutámico y la glutamina son las mejores fuentes de nitrógeno. Existen algunos otros metabolitos que constituyen fuentes de nitrógeno secundarias; entre ellos se encuentran; los nitratos, ni tritos, las purinas, las proteínas y muchos aminoácidos. El uso de estos compuestos como fuentes de nitrógeno, supone la síntesis o activación de enzimas catabólicas que los degradan hasta amonio, la asimilación de este compuesto dá como resultado la síntesis del ácido glutámico y de la glutamina, intermediarios metabólicos, que distribuyen su nitrógeno en la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares; vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas.

### Asimilación de amonio - Biosíntesis de ácido glutámico y glutamina.

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 procariotes y en eucariotes sencillos como *Neuspora crassa*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* y *Candida*, el amonio es asimilado prin cipalmente a través de la deshidrogenasa glutámica NADP- dependiente (GDH-NADP). La reacción catalizada por esta enzima, es una ami

nación reductiva del ácido  $\alpha$ -cetoglutárico:



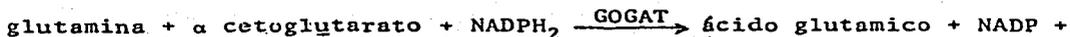
El ácido glutámico, en presencia de amonio, y ATP es convertido en glutamina, en una reacción catalizada por la enzima glutamino sin tetasa (GS).



En los organismos, existen por lo tanto dos enzimas capaces de asimilar el amonio: la GDH-NADP y la GS.

En 1970, Tempest y Col., reportaron la existencia de una ruta alternativa para la síntesis de ácido glutámico en (*Aerobacter aerogenes*) *Klebsiella aerogenes*. Estos autores encontraron que cuando *K. aerogenes* se cultivaba en un quemostato limitado de amonio, la actividad de la GDH-NADP disminuía considerablemente; por el contrario la actividad de glutamino sintetasa aumentaba. La incubación de extractos libres de células en presencia de glutamina,  $\alpha$  - cetoglutaratato y NADPH, resultaba en una considerable síntesis de glutamato. La conclusión de estos autores fue que en limitación de amonio, la asimilación de este compuesto y la síntesis de ácido glutámico procedía por acción de la glutamino sintetasa y de una nueva enzima que se denominó glutamino-amido - 2 oxoglutaratato ami notransferasa (glutamato sintasa - GOGAT).





Posteriormente, Meers y Tempest (1970) determinaron la presencia de GOGAT en algunas otras bacterias. En todos los casos analizados, se encontró que en limitación de amonio, la GDH-NADP disminuía, mientras que la GOGAT aumentaba. En *Bacillus*, donde aparentemente no se ha encontrado GDH-NADP, la síntesis de GOGAT era constitutiva. En 1975, Senior realizó estudios en quemostato donde comparó el funcionamiento de la vía GDH-GS VS GS-GOGAT en *K. aerogenes* y *Escherichia coli*. Sus resultados demuestran que en *K. aerogenes*, la glutamato deshidrogenasa se reprime durante la limitación de nitrógeno, mientras que la glutamato sintasa se induce.

A partir de los trabajos de Tempest, la GOGAT empezó a ser estudiada en una variedad de microorganismos procariotes y eucariotes. Asimismo, la búsqueda de esta enzima cobró importancia en sistemas como los vegetales superiores, en donde el papel de la GDH-NADP era poco claro.

Uno de los aspectos mas importantes en el estudio de la GOGAT ha sido el de definir el papel fisiológico y la regulación coordinada entre esta enzima y la GDH-NADP. En un principio se consideró, que al igual que en *K. aerogenes*, el papel de esta proteína, sería el de participar en la síntesis de ácido glutámico y en la asimilación de amonio, cuando este ultimo compuesto, se encontrara en concentraciones limitantes. Sin embargo, el trabajo de algunos grupos de investigación ha demostrado que esta enzima además cumple otras funciones. (Calderón y Mora, 1985).

El trabajo que nosotros hemos desarrollado en *Saccharomyces cerevisiae*, ha tenido como objetivo el estudio de la participación alternativa de la GDH-GS y de la vía GS-GOGAT en la síntesis de ácido glutámico y en la asimilación de amonio.

A continuación presentaré algunos aspectos de la regulación y del funcionamiento de las vías GDH-NADP y GS-GOGAT en algunos microorganismos.

#### Asimilación de amonio (GDH-GS VS GS-GOGAT).

a) *Neurospora crassa*. Uno de los microorganismos eucariotes en donde se ha estudiado mas detenidamente la asimilación de amonio, ha sido *Neurospora crassa*. Este hongo posee una glutamino sintetasa compuesta por dos monómeros diferentes ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que poseen diferente movilidad electroforética (Sánchez y Col., 1980). Los monómeros  $\alpha$  y  $\beta$  constituyen diferentes enzimas con formas tetramérica y octamérica respectivamente (Dávila y Col., 1980). *N. crassa*, posee una deshidrogenasa glutámica NADP- dependiente. Esta enzima es un hexámero compuesto de monómeros idénticos, cada uno esta constituido por 452 aminoácidos (Wootton y Col., 1974). La actividad de esta enzima es mayor cuando el hongo se cultiva en amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno, y disminuye cuando el ácido glutámico o la glutamina se presentan como únicas fuentes de nitrógeno. Esta regulación se lleva a cabo a nivel de síntesis de la enzima (Hernández y Col., 1983). La glutamato sintetasa de *N. crassa* se ha purificado; esta enzima se compone de un solo monomero con un PM de 200,000 (Hummelt y

Mora, 1980). El gene estructural (en (am) -2) ha sido identifi  
cado (Romero y Dávila, 1986). Mora y Col., (1987) han encontra  
do que esta enzima se regula negativamente por algunos cetoáci  
dos. Lomnitz y Col., (1987) han obtenido resultados que señalan  
que en *N. crassa*, la GDH-NADP es la responsable de la síntesis  
de ácido glutámico, tanto en limitación como en exceso de amoni  
o. En este hongo, la actividad de la GDH-NADP es similar cuan  
do el microorganismo se cultiva en limitación o exceso de amoni  
o. Asimismo no se observa que la actividad de GOGAT aumente  
en limitación de amonio. Estos autores concluyen que la GDH-  
NADP tiene una mayor capacidad para asimilar amonio que la GS,  
a pesar de que se ha reportado que esta última posee una mayor  
afinidad por amonio (Wootton, 1983). Los resultados obtenidos  
por Lomnitz y Col., (1987) y Calderón y Mora (1985), les han  
permitido proponer que la función principal de la GOGAT en *N.*  
*crassa* es la de reciclar parte del nitrógeno orgánico de gluta  
mina a glutamato, tanto en limitación como en exceso de amonio.  
Sin embargo, los autores señalan que esta función cobra particu  
lar importancia en limitación de amonio, ya que en esta condi-  
ción, la GS, debido a su alta afinidad por amonio, podría asimi  
lar este último compuesto muy eficientemente, lo cual podría re  
sultar en una deprivación de ácido glutámico. El papel de la  
GOGAT en estas condiciones sería el de reciclar la glutamina ha  
cia glutámico, evitando así la deprivación de este último amino  
ácido y manteniéndose un nivel adecuado de glutamato y glutamina.  
La proposición de Lomnitz y Col (1987), resulta muy importante,

ya que es el primer caso, en donde se le adjudica a la GOGAT un papel diferente al de la síntesis de glutámico y asimilación de amonio en limitación de este último compuesto.

- b) *Aspergillus nidulans*. En este organismo, los niveles de GDH-NADP y de GS son regulados por la fuente de nitrógeno, de manera similar a la descrita para *N. crassa* (Pateman, 1969). Recientemente se ha encontrado que este hongo también posee actividad de GOGAT (Kusnan y Col., 1987). Al igual que en *N. crassa*, la actividad de esta enzima no varía cuando se modifica la fuente de nitrógeno. Estos autores proponen que el papel de GOGAT en *Aspergillus* es el de sintetizar ácido glutámico en limitación y en exceso de amonio; sin embargo, la contribución a la síntesis de glutámico por cada una de las 2 vías (GDH-GS; GS GOGAT) no ha sido determinado.
- c) *Escherichia coli*. Esta bacteria posee una deshidrogenasa glutámica NADP dependiente, constituida por 6 cadenas polipeptídicas idénticas con un peso molecular de 50,000 (Sakamoto y Col., 1975). La glutamino sintetasa de *E. Coli* puede existir en dos formas catalíticamente distintas que son interconvertibles. Esta enzima está compuesta por 12 subunidades, cada una de las cuales puede tener o no una molécula de ácido adenílico. La adenilación disminuye su actividad y la hace sensible a regulación alostérica por productos finales (Shapiro y Col., 1968; Hening & Ginsburg, 1971).
-

La glutamato sintasa de *E. Coli*, está compuesta por 4 dímeros, cada uno formado por 2 subunidades diferentes con pesos moleculares de 135,000 y 53,000 (Miller & Stadtman, 1972). Los genes estructurales de la subunidad grande y pequeña han sido denominados *glt B* y *glt D* respectivamente (Garcíarrubio y Col., 1983). Estos genes han sido clonados (Lozoya y Col., 1983). Pahel y Col (1978) encontraron, que mutaciones en el gene *glt B*, afectaban la biosíntesis de GOGAT y simultáneamente conferían el fenotipo *Ntr<sup>-</sup>*; es decir, estas mutantes eran incapaces de utilizar arginina y prolina como fuentes de nitrógeno. Asimismo, estas mutantes eran incapaces de reprimir la GS, cuando se cultivaban en limitación de amonio (Brenchley y Col., 1973). Por otro lado, Servín - González & Bastarrachea (1984). encontraron que mutantes alteradas en *glt B* eran incapaces de activar el transporte de metilamonio. Estos autores han propuesto, que la síntesis del transportador de alta afinidad por amonio pudiera estar regulado por el sistema *Ntr*, esto explicaría el hecho de que mutantes *glt B* fueran incapaces de crecer en bajo amonio. Recientemente Castaño y Col (1988) han establecido la existencia del operón *glt BDF*; este operón comprende los genes que codifican para cada una de las 2 subunidades y un tercer gene cuyo producto, parece estar involucrado en la regulación *Ntr*. Los resultados de estos autores indican que el fenotipo pleiotrópico presentado por mutaciones en *glt B*, se debía a un efecto polar sobre *glt F*. Cuando *E. Coli* se cultiva en limitación de amonio,

se encuentran niveles inducidos de GS desadenilada, mientras que en exceso de amonio la GS se reprime y adenila. En estas condiciones la actividad de GOGAT no cambia (Miller & Stadtman, 1972). Senior (1975) realizó un estudio fisiológico sobre la participación de la vía GS-GOGAT en la asimilación de amonio y síntesis de glutámico, cuando *E. Coli* se cultiva en limitación de amonio. Sus resultados señalan, que en esta bacteria, la GDH-NADP, participa en la asimilación de amonio, aún en limitación de este compuesto, a diferencia de lo encontrado para *Klebsiella aerogenes* y algunas otras bacterias (Meers & Tempest, 1970). Con respecto al papel de la GOGAT en *E. Coli*, Senior (Senior, 1975) concluye que esta bacteria utiliza la GDH para asimilar nitrógeno en limitación de amonio. De suerte que el papel de la vía GS-GOGAT en *E. Coli* aún no ha sido determinado.

- d) *Bacillus subtilis*. En esta bacteria, la glutamino sintetasa, juega un papel central en la asimilación de amonio, ya que en este microorganismo no se ha detectado actividad de GDH biosintética (Freese y Col. 1964). A diferencia de lo descrito para *E. Coli*, la GS de *Bacillus* no se regula por un sistema de adenilación-desadenilación; en este sistema, la GS se regula por la fuente de nitrógeno y está sujeta a inhibición por glutamina y por los productos finales del catabolismo de este aminoácido (Duel y Col., 1970; Duel & Prusiner, 1974). En este organismo, la vía de asimilación de amonio es la GS-GOGAT y mutantes alteradas en GOGAT son auxotrofas de glutámico (Dean & Aronson,

1980). La GOGAT se derreprime cuando la bacteria se cultiva en amonio o en nitrato y se reprime en presencia de glutamato (Fui Lin Pan & Coote., 1979). La GOGAT de *B subtilis* esta constituida por dos subunidades, codificadas por los genes *glt A* y *glt B* (Desphande & Kane., 1980), estos genes han sido clonados (Bohannon y Col. 1985) y se ha encontrado que las variaciones de la actividad de GOGAT en respuesta a la fuente de nitrógeno se regulan a nivel de transcripción.

- e) Bacterias fijadoras de nitrógeno. *Azospirillum brasiliense*, se ha encontrado en la rizosfera de ciertos pastos (Baldani & Dokereiner, 1980) y en los espacios intercelulares de las raíces de algunos cereales (Patriquin y Col., 1983). Sin embargo, su participación en el establecimiento de una verdadera simbiosis es poco clara. Esta bacteria presenta actividad de GS-GOGAT y GDH; algunos autores han considerado, que cuando este organismo se cultiva en bajo amonio, la vía de asimilación de amonio y síntesis de glutámico es la GS-GOGAT, mientras que en alto amonio funciona la vía GDH-GS. Recientemente, Westby y Col (1987), utilizando  $N^{13}$  como rastreador metabólico, determinaron que en *A. brasiliense*, la vía GS-GOGAT es la vía primaria de asimilación en alto y bajo amonio, y que la GDH juega un papel secundario.

*Rhizobium phaseoli*. Esta bacteria forma asociación simbiótica con el frijol. *R. phaseoli*, posee dos glutamino sintetasas (GSI y GSII). Bravo & Mora, (1988), han propuesto que cuando *R. phaseoli*

se cultiva en vida libre, la GSI y GSII se regulan de manera recíproca. Cuando el cociente  $\alpha$  cetoglutarato/glutamina disminuye, la GSI se adenila. Cuando se inactiva la GSI, la GSII se induce. La GSII también puede inactivarse, esto ocurre cuando se adicionan altas concentraciones de amonio, en estas condiciones, las células excretan amonio. En este organismo no se detecta actividad de GDH. (Bravo & Mora, 1988). La actividad de GOGAT varía dependiendo de la fuente de nitrógeno y de carbono donde se cultive, algunos cetoácidos inhiben a esta enzima (Bravo & Mora, 1988). En *R. Phaseolii*, por lo tanto, la vía de asimilación de amonio es la GS-GOGAT.

Prácticamente, todos los organismos fijadores de nitrógeno que han sido estudiados hasta la fecha, durante la fijación de nitrógeno, asimilan amonio por la vía GS-GOGAT (Brown, 1976; Kleiner y Col., 1981; Nagatani y Col., 1971; Bravo y Mora 1988). Por otro lado, existe evidencia que indica que la presencia de una GDH activa es incompatible con la fijación de nitrógeno durante la simbiosis (Osburne y Singer, 1980; y Bravo y Col. 1988). Recientemente, Kanamori y Col. (1987), han presentado evidencia que indica que en *Bacillus polymyxa*, el amonio se asimila por la GDH; aún en células que están fijando nitrógeno. En *B. polymyxa* la actividad específica de la glutamato sintasa no varía con la fuente de nitrógeno, mientras que los niveles de GS y GDH si parecen regulados por la fuente de nitrógeno. Estos autores sugieren que la incapacidad de *B. polymyxa* para derreprimir la vía GS-GOGAT en respuesta a una limitación de amonio, resulta desventajoso para esta bacteria cuando compite con otras bacterias fi

jadoras de nitrógeno. *Bacillus macerans* representa un ejemplo similar al de *B. polymyxa* (Kanamori y Col., 1987). Dado que *B. macerans* fija nitrógeno en anaerobiosis estricta, la utilización de la GDH podría resultar conveniente, ya que implica un menor gasto de ATP que la vía GS-GOGAT (Kanamori y Col., 1987). Resumiendo la información presentada, se podría decir, que en microorganismos eucariotes como *N. crassa* y *A. nidulans*, tanto la vía GDH-GS como la GS-GOGAT, participan en la síntesis de ácido glutámico. En procariotes existen organismos en los que la GDH está ausente y la única vía de asimilación es la GS-GOGAT (*Bacillus subtilis*); en otros existen claramente dos vías que funcionan alternativamente: una opera en bajo amonio (GS-GOGAT) y la otra en alto amonio (GDH-GS) (*Klebsiella aerogenes*). En *E. Coli* se encuentran las 3 enzimas, pero el papel de cada una de las vías es poco claro. En bacterias fijadoras de nitrógeno, aparentemente la regla sería que durante la fijación de nitrógeno opera la vía GS-GOGAT (*Rhizobium*, *Azospirillum*). Sin embargo, empiezan a aparecer algunas excepciones (*B. macerans*, *B. polymyxa*), en las que parece funcionar la vía GDH-GS. Resulta evidente, que el trabajo publicado por Tempest y Col., en 1970, abrió una línea de investigación importante que ha permitido un mejor conocimiento de los procesos de asimilación de amonio y que ha puesto de manifiesto la gran versatilidad y plasticidad que tienen los microorganismos para adaptarse a crecer en diferentes condiciones fisiológicas.

A continuación presentaré una breve descripción de las vías de

asimilación de amonio en *Saccharomyces cerevisiae*.

Al igual que en otros microorganismos, *S. cerevisiae* posee una deshidrogenasa glutámica -NADP dependiente. El gene estructural de esta enzima se ha denominado *GDH1*; mutantes alteradas en este gene, crecen con un tiempo de duplicación 1 hora mayor que el de la cepa silvestre (Drillien & Lacroute, 1972). El crecimiento que presentan estas mutantes se debe a la operación de la GOGAT y GS como una ruta alternativa para sintetizar ácido clutámico (Folch, 1986), y no a la participación de la GDH-NAD, como se había propuesto (Grenson, y Col., 1974).

La actividad de la GDH-NADP aumenta cuando la levadura se cultiva en amonio como fuente de nitrógeno y disminuye en presencia de ácido glutámico (Roon & Even, 1973).

Cuando la levadura se depriva de glucosa, la actividad de GDH-NADP disminuye. Mazon y Col. (1978), han encontrado, que esta disminución se debe a una degradación de la enzima. Por otro lado, la GDH-NADP no se induce en mutantes que presentan una alteración en la aconitasa y que por lo tanto no sintetizan  $\alpha$ -ceto-glutarato (González y Col, 1985); esto sugiere que el propio  $\alpha$ -cetoglutatarato o algún otro intermediario del ciclo de Krebs, son moduladores positivos de la actividad de esta enzima (González y Col. 1985). La actividad de la GDH-NADP, también disminuye cuando la concentración intracelular de amonio aumenta, esta disminución en la actividad posiblemente se debe a la represión de la síntesis de esta enzima (Bogonez y Col. 1985).

El hecho de que la GDH-NADP disminuya al aumentar el amonio, se

ha interpretado como un mecanismo que impide la depleción de la poza de  $\alpha$ -cetoglutarato.

La glutamino sintetasa de *S. cerevisiae*, esta compuesta de 10-12 monómeros de un peso molecular de 43,000 Mitchell & Magasanick, 1983). El gene estructural de esta enzima, (*gln 1*) ha sido clonado (González y Col., 1984). Los niveles de GS están regulados por la naturaleza de la fuente de nitrógeno en que se cultiva la levadura (Dubois & Grenan, 1974) y se ha encontrado que la inducción de esta actividad, corresponde a síntesis de Novo. (Mitchell & Magasanick, 1983). Por otro lado, la actividad está regulada por un sistema de inactivación irreversible, probablemente proteolítico (Mitchell & Magasanick 1984).. Se han identificado 3 sistemas regulatorios que controlan la producción de GS en *S. cerevisiae*; el primero de ellos responde a los niveles de glutamina, y depende del producto de *Gln 3*, el segundo, pertenece al control general de aminoácidos que controla la represión de varias enzimas biosintéticas a la deprivación de aminoácidos, este sistema es mediado por *GCN4*, por último, el tercer sistema responde a limitación de purinas (Mitchell & Magasanick 1984).

En *S. cerevisiae* se ha reportado la existencia de la actividad de GOGAT (Roon y Col. 1974). Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad y se ha encontrado que está constituida por dos subunidades, con pesos moleculares de 169,000 y 61,000. (Roon y Col, 1974; Masters & Meister, 1982).

En *S. cerevisiae*, la GOGAT ha sido poco estudiada y la activi-

dad de esta enzima no parece variar al modificarse las condi  
ciones de cultivo (Roon y Col. 1982). Recientemente, Folch  
(1986) ha reportado el aislamiento de mutantes alteradas en  
GOGAT; dobles mutantes alteradas en GDH-NADP y GOGAT, son anxó  
trofos de glutámico (Folch (1986)).

## OBJETIVOS

Uno de los aspectos mas interesantes sobre el estudio de la GOGAT, ha sido la asignación de su papel fisiológico. En microorganismos que poseen GOGAT y GDH, los estudios mas claros han sido los realizados en *K. aerogenes* (Senior 1975) y *N. crassa* (Lomnitz y Col. 1987). En el primer caso el papel de la GOGAT es el de asimilar amonio en bajas concentraciones y en el segundo caso el papel que se le ha asignado a la GOGAT es el de regular los niveles de glutámico y glutamina.

En *S. cerevisiae*, se ha reportado, que en limitación de amonio, mutantes que carecen de GDH-NADP o de GOGAT, crecen con igual tiempo de duplicación que la cepa silvestre (Folch, 1986) por lo tanto, se puede concluir que en esta levadura, la síntesis de glutámico y la asimilación de amonio en bajas concentraciones, puede correr por cuenta de la vía GS-GOGAT o de la vía GDH-GS.

Los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

- 1.- Determinar el papel fisiológico de la GOGAT en exceso de amonio en *S. cerevisiae*.
- 2.- Determinar algunos elementos de control que coordinan la operación de la vía GDH-GS VS GS-GOGAT en exceso de amonio.

Primero se anexa una copia del trabajo titulado:

Coordinated Regulation of Ammonium Assimilation and Carbon Catabo-

lism by Glyxylate in *Saccharomyces cerevisiae*.

Después se presentara una sección de RESULTADOS, donde se incluiran experimentos adicionales que aún no han sido publicados. Finalmente en la última parte se presentará una DISCUSION global de los resultados incluidos en el trabajo publicado y en esta tesis.

## Coordinated Regulation of Ammonium Assimilation and Carbon Catabolism by Glyoxylate in *Saccharomyces cerevisiae*

By ALICIA GONZÁLEZ,\* LAURA RODRÍGUEZ,  
JORGE FOLCH, MARIO SOBERÓN AND HIRAM OLIVERA  
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Departamento de Biología  
Molecular de Plantas, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

(Received 29 December 1986; revised 24 March 1987)

---

The activities of citrate synthase (EC 4.1.3.7) and NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase (GDH) (EC 1.4.1.4) of *Saccharomyces cerevisiae* were inhibited *in vitro* by glyoxylate. In the presence of glyoxylate, pyruvate and glyoxylate pools increased, suggesting that glyoxylate was efficiently transported and catabolized. Pyruvate accumulation also indicates that citrate synthase was inhibited. A decrease in the glutamate pool was also observed under these conditions. This can be attributed to an increased transamination rate and to the inhibitory effect of glyoxylate on NADP<sup>+</sup>-dependent GDH. Furthermore, the increase in the ammonium pool in the presence of glyoxylate suggests that NADP<sup>+</sup>-dependent GDH was being inhibited *in vivo*, since the activity of glutamine synthetase did not decrease under these conditions. We propose that the inhibition of both citrate synthase and NADP<sup>+</sup>-dependent GDH could form part of a mechanism that regulates the internal 2-oxoglutarate concentration.

---

### INTRODUCTION

NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase (GDH) catalyses the synthesis of glutamate from ammonium and 2-oxoglutarate (Holzer & Schneider, 1957). Ammonium is derived from the metabolism of nitrogenous compounds, or from the medium, and 2-oxoglutarate from carbon metabolism. Thus, ammonium assimilation constitutes the metabolic process in which carbon and nitrogen metabolism meet, and NADP<sup>+</sup>-dependent GDH is the enzyme that links these two metabolic pathways. It has been proposed that in *Saccharomyces cerevisiae*, 2-oxoglutarate, or some other intermediate of the tricarboxylic acid cycle, modulates NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity (González *et al.*, 1985). Furthermore, it could be expected that fluctuations in the intracellular levels of intermediates of the cycle could in turn regulate the activity of the NADP<sup>+</sup>-dependent GDH. Thus, regulation of the tricarboxylic acid cycle could have a direct effect on NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity and therefore on ammonium assimilation. This mechanism may constitute a regulatory link between these two metabolic pathways, which could determine the amount of 2-oxoglutarate and ammonium that can be assimilated in a given physiological condition.

It has been shown that cells of *Escherichia coli* growing on glyoxylate contain much lower levels of citrate synthase than similar cells growing on acetate (Kornberg, 1966), suggesting that this compound could modulate the operation of the tricarboxylic acid cycle by regulating the levels of citrate synthase. Furthermore, since the metabolism of glyoxylate through the dicarboxylic acid cycle does not produce 2-oxoglutarate, it would be expected that in the presence of glyoxylate, intracellular 2-oxoglutarate levels would be decreased, and that this would affect the activity of the NADP<sup>+</sup>-dependent GDH and thus ammonium assimilation. We

---

Abbreviations: GDH, glutamate dehydrogenase; MM, minimal medium.

studied the effect of glyoxylate on citrate synthase and NADP<sup>+</sup>-dependent GDH in *S. cerevisiae* in order to determine whether this 2-oxoacid could play a role in the regulation of carbon and nitrogen metabolism.

#### METHODS

**Strain and growth conditions.** The wild-type strain S288C (*MATa mal gal2*) was obtained from the Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA. Cells were routinely grown on minimal medium (MM) containing salts, trace elements and vitamins following the formula of Difco Yeast Nitrogen Base. Glucose (2% w/v) was used as carbon source and 40 mM-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as nitrogen source. Glyoxylate or pyruvate were added to the cultures, as appropriate, as aqueous autoclaved solutions. The cultures were incubated at 30 °C with agitation. Cells were grown on YPD medium comprising 1% (w/v) yeast extract (Difco), 2% (w/v) peptone (Difco) and 2% (w/v) glucose, until they reached stationary phase; they were then washed and resuspended in MM. These suspension were used to inoculate cultures to an OD<sub>600</sub> of 0.05.

**Extraction and determination of intracellular metabolites.** For the estimation of 2-oxoglutarate, pyruvate and glyoxylate, extracts were prepared as described by Kang *et al.* (1982). Ammonium was extracted by the method of Tempest *et al.* (1970) and Tachiki *et al.* (1981). The concentrations of ammonium and 2-oxoglutarate were determined with beef GDH by following NADH oxidation at 340 nm (Dubois *et al.*, 1974). Pyruvate concentration was determined with beef lactate dehydrogenase by following NADH oxidation at 340 nm (Bergmeyer, 1963). Glyoxylate was determined by the method of Tribels & Vogel (1966).

Amino acids were extracted and determined as described by González *et al.* (1983). For enzyme determinations soluble extracts were prepared by grinding whole cells, suspended in their corresponding extraction buffer, with glass beads in a Braun cell disrupter. Citrate synthase (EC 4.1.3.7), NADP<sup>+</sup>-dependent GDH (EC 1.4.1.4) and glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) were assayed by the methods of Parvin (1969), Doherty (1970) and Ferguson & Sims (1974) respectively. Protein was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as standard.

**Chemicals.** All 2-oxoacids, beef GDH, beef lactate dehydrogenase and bovine serum albumin were obtained from Sigma.

#### RESULTS AND DISCUSSION

##### *Effect of glyoxylate on citrate synthase activity*

Citrate synthase from cells grown on MM for 6 h was inhibited by glyoxylate but not pyruvate (Fig. 1). In order to study whether the inhibition of citrate synthase could alter the carbon flow through the tricarboxylic acid cycle we determined the intracellular content of 2-oxoglutarate. In glyoxylate-treated cells 2-oxoglutarate levels were 4-fold higher than in cells incubated in MM without glyoxylate; glyoxylate-treated cells had almost 30-fold higher glyoxylate levels than those from the untreated culture (Table 1). This could be explained by assuming that the utilization of 2-oxoglutarate by NADP<sup>+</sup>-dependent GDH had diminished. It has been proposed that the catabolism of glyoxylate through the dicarboxylic acid cycle can result in the production of pyruvate (Kornberg, 1966). If this were the case, the increase in the pyruvate pools could shift the endogenous glutamate pools towards transamination, which would result in increased levels of 2-oxoglutarate. The pyruvate level in glyoxylate-treated cells was 14-fold higher than cells in MM (Table 1).

##### *Effect of glyoxylate on nitrogen assimilation*

Since a decrease in NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity would result in ammonium accumulation, we measured the amount of ammonium present in glyoxylate-treated and untreated cells. Ammonium levels were 2.8-fold higher in glyoxylate-treated cells (Fig. 2*a*). This accumulation could be attributed to a decrease in ammonium assimilation through NADP<sup>+</sup>-dependent GDH or through glutamine synthetase. Since the activity of the latter enzyme reached values 4-fold higher in glyoxylate-treated cells than in control cells (Fig. 3), ammonium accumulation can only be the result of decreased NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity. Furthermore, the rise in glutamine synthetase activity (Fig. 3) was accompanied by a decrease in the ammonium pool that had accumulated, suggesting that under these conditions ammonium assimilation proceeded through glutamine synthetase. As a control, we determined the effect of the addition of pyruvate instead of glyoxylate. The ammonium pool in the pyruvate-treated cells was very similar to that in the control culture (Fig. 2*b*). 2-Oxoglutarate levels were similar in cells

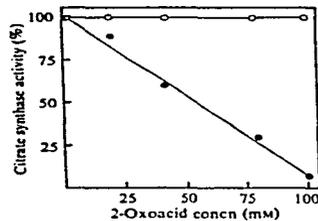


Fig. 1

Fig. 1. Effect of glyoxylate (●) and pyruvate (○) on citrate synthase. Activity was assayed *in vitro*. The activity corresponding to 100% was 4.7 U (mg protein)<sup>-1</sup>. Results shown are representative of at least three determinations; variation was 5 to 10%.

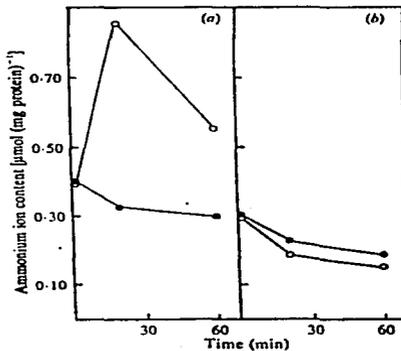


Fig. 2

Fig. 2. Effect of glyoxylate and pyruvate on ammonium ion pools. (a) Cells were grown in MM for 2 h; the culture was then divided and 20 mM-glyoxylate (○) was added to one half; the rest of the culture was left untreated (●). Ammonium pools were then determined. (b) Cells were treated as in (a), but half the culture was treated with 20 mM-pyruvate (○) instead of glyoxylate; the other half was again untreated (●). Results shown are representative of at least three determinations; variation was 5 to 10%.

Table 1. Intracellular pools of 2-oxoacids in *S. cerevisiae* treated with glyoxylate or pyruvate

Cells were grown in MM for 2 h; the culture was then divided, and half was treated with 20 mM-glyoxylate; the other half was left untreated. In a separate experiment cells were treated with 20 mM-pyruvate instead of glyoxylate. After 20 min, samples were removed from both cultures, the cells were washed with MM and extracts were prepared and assayed as described in Methods. Results shown are means of three determinations; values in parentheses show variance of the mean.

2-Oxoacid	2-Oxoacid content [nmol (mg protein) <sup>-1</sup> ]		
	MM	MM + glyoxylate	MM + pyruvate
Glyoxylate	11.61 (1.43)	326.60 (288.80)	9.00 (0.66)
Pyruvate	51.44 (10.52)	758.30 (972.20)	325.00 (416.67)
2-Oxoglutarate	9.20 (0.24)	39.43 (11.61)	9.73 (0.33)

in MM with and without pyruvate (Table 1). These data indicate that glyoxylate negatively modulates NADP<sup>+</sup>-dependent GDH, whereas pyruvate does not. Glyoxylate inhibited NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity *in vitro* while pyruvate did not (Fig. 4). This suggests that inhibition of NADP<sup>+</sup>-dependent GDH by glyoxylate provides a mechanism which compensates for the decrease in carbon flow due to the inhibition of citrate synthase by glyoxylate. This mechanism could play a role when poor carbon sources such as acetate are provided, since in these conditions, the activity of 2-oxoglutarate should be strictly regulated. In this regard, it has been reported that the enzymes which participate in glyoxylate synthesis are induced in acetate-

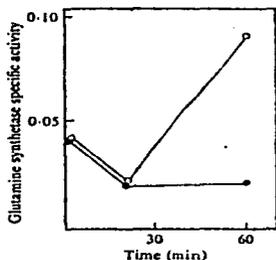


Fig. 3

Fig. 3. Effect of glyoxylate on glutamine synthetase specific activity. Cells were grown in MM for 2 h; the culture was then divided and 20 mM-glyoxylate (○) was added to one half; the rest of the culture was left untreated (●). Glutamine synthetase activity was then determined. Specific activity is expressed as  $\mu\text{mol } \gamma\text{-glutamyl hydroxamate produced min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$  at  $30^\circ\text{C}$ . Results shown are representative of at least three determinations; variation was 5 to 10%.

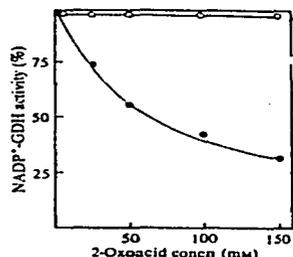


Fig. 4

Fig. 4. Effect of glyoxylate (●) and pyruvate (○) on NADP<sup>+</sup>-dependent GDH. Activity was assayed *in vitro*. The activity corresponding to 100% was  $5.9 \text{ U } (\text{mg protein})^{-1}$ . Results shown are representative of at least three determinations; variation was 5 to 10%.

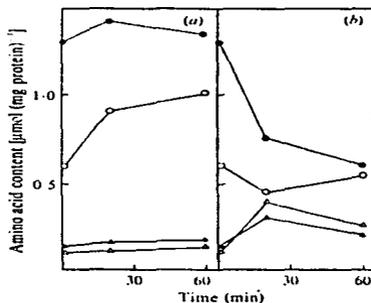


Fig. 5. Effect of glyoxylate on amino acid pools. Cells were grown in MM for 2 h; the culture was then divided and 20 mM-glyoxylate was added to one half (b); the rest of the culture was left untreated (a). Amino acid pools (●, glutamate; ○, glutamine; ▲, alanine; Δ, glycine) were then determined. Results shown are representative of at least three determinations; variation was 5 to 10%.

grown cells (Gosling & Duggan, 1971). It has also been suggested (Bogonez *et al.*, 1985) that under certain physiological conditions, changes in the NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity provide control over the rate of 2-oxoglutarate utilization, resulting in the maintenance of a minimum pool of this 2-oxoaacid. It is worth noting that strain S288C grew equally well with or without glyoxylate (data not shown), indicating that carbon and nitrogen flows were being coordinately regulated, thus allowing the maintenance of the same growth rate.

*Effect of glyoxylate on nitrogen distribution*

Amino acid analyses were done on glyoxylate-treated and untreated cells. The glutamate pool decreases very rapidly after glyoxylate addition, whereas in MM it remained almost constant (Fig. 5). At the same time, the alanine and glycine pools rose in the presence of glyoxylate. These results suggest that the glutamate amino nitrogen is being distributed through transamination. Furthermore, in glyoxylate-treated cells, the intracellular concentration of glutamine decreased and then increased slightly (Fig. 5b), suggesting that the increases in alanine and glycine pools could also be due to the functioning of glutamine transaminase, since this enzyme uses pyruvate and glyoxylate as substrates (Soberón & González, 1987). These results indicate that high intracellular concentrations of 2-oxoacids cause channelling of glutamate and glutamine towards transamination. This results in a decreased glutamine pool which allows glutamine synthetase activity to increase (Fig. 3) and increases ammonium assimilation through the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway (Tempest *et al.*, 1970). As judged by amino acid accumulation and growth, total ammonium assimilation was not diminished in glyoxylate-treated cultures (Fig. 5). Our results indicate that the decrease in NADP<sup>+</sup>-dependent GDH activity is due to the inhibitory effect of glyoxylate and that this 2-oxoacid effects coordinate regulation of carbon and nitrogen metabolism.

The authors are grateful to Gloria Soberón, Irene Castaño and David Romero for their critical review of the manuscript, to Jaime Mora, Guillermo Dávila and Edgardo Escamilla for their enthusiasm and criticism throughout this work, and to Lucila Lulo for secretarial assistance. This work was supported in part by a grant from Fondo de Estudios e Investigación Ricardo J. Zevada.

## REFERENCES

- BERGMEYER, M. J. (1963). *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 253-259. New York & London: Academic Press.
- BOGONEZ, E., SATRUSTEGI, J. & MACHADO, A. (1985). Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **131**, 1425-1432.
- DUBOIS, E., GRENSON, M. & WIAME, J. M. (1974). The participation of the anabolic glutamate dehydrogenase in the nitrogen catabolite repression of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **48**, 603-616.
- DOHERTY, D. (1970). L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods in Enzymology* **17**, 850-856.
- FERGUSON, A. R. & SIMS, A. P. (1974). The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *Journal of General Microbiology* **80**, 159-171.
- GONZÁLEZ, A., TENORIO, M., VACA, G. & MORA, J. (1983). *Neurospora crassa* mutant impaired in glutamine regulation. *Journal of Bacteriology* **155**, 1-7.
- GONZÁLEZ, A., RODRÍGUEZ, L., OLIVERA, H. & SOBERÓN, M. (1985). NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase activity is impaired in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that lack asconitase. *Journal of General Microbiology* **131**, 2565-2571.
- GOSLING, J. P. & DUGGAN, P. F. (1971). Activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, glyoxylate cycle enzymes, and fructose diphosphatase in baker's yeast during adaptation to acetate oxidation. *Journal of Bacteriology* **106**, 908-914.
- HOLZER, H. & SCHNEIDER, S. (1957). Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochemische Zeitschrift* **329**, 361-367.
- KANG, L., KEELER, M., DUNLOP, P. C. & ROON, R. J. (1982). Nitrogen catabolite repression in a glutamate auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **151**, 29-35.
- KORNBERG, H. L. (1966). Anaplerotic sequences and their role in metabolism. *Essays in Biochemistry* **2**, 1-31.
- PARVIN, R. (1969). Citrate synthase from yeast. *Methods in Enzymology* **13**, 16-19.
- SOBERÓN, M. & GONZÁLEZ, A. (1987). Glutamine degradation through the  $\omega$ -amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **133**, 9-14.
- TACHIKI, T., TORORO, K., HORINO, I. & TOCHIBURO, T. (1981). Assimilation of ammonia by *Gluconobacter suboxydans* through glutamine synthetase/glutamate synthase pathway. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 1715-1717.
- TEMPEST, D. W., MEERS, J. L. & BROWN, C. M. (1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochemical Journal* **117**, 405-407.
- TRIBELS, F. & VOGEL, G. A. (1966). Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **113**, 292-320.

## RESULTADOS.

### Efecto del glioxilato sobre la biosíntesis de ácido glutámico.

Los resultados que se presentan en el artículo anexo, indican que cuando se adiciona glioxilato a un cultivo de la cepa silvestre, la GDH-NADP se inhibe dando como resultado la acumulación intracelular de amonio. Al mismo tiempo, las pozas de glutamato y glutamina disminuyen; esta disminución, puede atribuirse a dos factores, por un lado, al incremento en la transaminación de glutámico y glutamina, producido por la elevación de  $\alpha$ -cetoácidos, que se presenta debido a la adición de glioxilato y por otro a la inhibición de la GDH-NADP. La disminución en la poza de glutamina permite la inducción de la glutamino sintetasa, que ahora es capaz de asimilar el amonio que se había acumulado. Este resultado sugiere que en esta condición, la vía de asimilación de amonio y de síntesis de ácido glutámico que pudiera operar sería la vía GS-GOGAT. En el artículo se presentan las pozas de glutámico, glutamino, glicina y alanina que se encuentran 30 y 60 minutos después de la adición de glioxilato. Sin embargo, si uno determina las pozas de estos aminoácidos algunas horas después de haber adicionado glioxilato, se encuentra que la concentración intracelular tanto de glutámico como de glutamina nuevamente se eleva (Fig. 1A). La tabla 1 muestra que la concentración intracelular de glioxilato permanece elevada aun 6 horas después de haber adicionado este compuesto. Por lo tanto en esta condición la GDH-NADP aún debe estar inhibido.

Estos datos indican que la resíntesis de glutámico probablemente ocurrió por acción de la GOGAT. El aumento en la poza de glutamino coincide con el aumento en la actividad de glutamino sintetasa (Fig. 2), la cual disminuye 3 horas después, cuando la poza de glutamino alcanza niveles elevados. Por otro lado, las pozas de glicina y alanina también se elevan debido a la alta concentración intracelular de pirúvico y glicílico. (Tabla 1). Esta tabla, también muestra las pozas intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato; como se puede apreciar, la concentración de este compuesto se eleva 20 minutos después de la adición de glioxilato, recuperando su nivel basal horas más tarde. Este dato indica que en presencia de pozas elevadas de glioxilato, el  $\alpha$ -cetoglutarato se consume; posiblemente por acción de la GOGAT. En virtud de que tenemos evidencia para suponer que la inhibición de la GDH-NADP por glioxilato podría ser de tipo competitivo, es importante notar que durante la elevación de la poza de glutámico los niveles de glioxilato son 52 veces mayores que los de  $\alpha$ -cetoglutarato.

La Fig. 1B muestra las pozas de glutámico, glutamino y alanina que se encuentran cuando no se adiciona glioxilato (La poza de glicina no fué detectable).

Los resultados hasta aquí presentados, indican que cuando *S. cerevisiae* se cultiva en presencia de glioxilato, la vía de asimilación de amonio y de síntesis de glutámico es la GS-GOGAT. Cabe enfatizar que en los experimentos descritos, las células se encontraban en medio mínimo conteniendo glucosa (2 %) y a este medio se adicionaba el glioxilato. Como se presenta en el artículo, el glioxilato inhi-

be a la citrato sintasa y en esta condición, el flujo del carbono proveniente de la glucosa disminuye, como lo evidencia la acumulación de piruvato (Tabla 1). En estas condiciones el metabolismo de glioxilato pudiera ser el responsable del aporte energético requerido por las células. Es decir, el ciclo de ácidos tricarbónicos jugaría su papel dual como generador de energía y de intermediarios. En esta circunstancia el funcionamiento de la vía GS-GOGAT y no de la vía GDH-GS, pudiera constituir un mecanismo para proteger la poza de  $\alpha$ -cetoglutarato (ver discusión). Tomando en cuenta estas consideraciones decidimos hacer un análisis de las vías de asimilación, cuando la fuente de energía fuese algún metabolito no fermentable que alimentara el ciclo de ácidos tricarbónicos.

#### Efecto de la fuente de carbono sobre las enzimas que participan en la asimilación de amonio.

Con el fin de analizar el papel de la GOGAT cuando *S. cerevisiae* se cultiva en exceso de amonio, en presencia de fuentes de carbono no fermentables, se cultivó la cepa silvestre S288C en 2 % de etanol como fuente de carbono.

En la Fig. 3, se observa que las actividades de GDH y GOGAT son similares tanto en etanol como en glucosa; sin embargo, en etanol se observa un aumento hasta de 5 veces en la actividad de GS. Con respecto a la encontrada en glucosa. Estos datos sugieren que la actividad de GDH pudiera estar inhibida "in vivo" y que esto resultara

en una disminución de la poza de glutamina permitiendo la inducción de la GS y posiblemente la operación de la vía GS-GOGAT. La Fig. 4 (AB), muestra el crecimiento de la cepa silvestre (S288C) y de la mutante 8-A, que carece de GDH-NADP (Folch 1986). Como se puede observar, ambas cepas crecen igual cuando se utiliza etanol como fuente de carbono, (Fig. 4B), mientras que en glucosa (Fig. 4A), la cepa silvestre crece considerablemente mejor que la mutante. La Fig. 4 (C), muestra las actividades de GDH encontradas para las dos cepas en etanol, se puede apreciar que la cepa silvestre posee una actividad que es hasta 80 veces mas elevada que la encontrada en la mutante. La actividad de GOGAT es similar en ambas cepas (Fig. 4 D). Estos datos sugieren que en etanol-amonio, la GDH de la cepa silvestre pudiera estar inhibida "*in vivo*". Con el fin de analizar este fenómeno mas detenidamente, cultivamos a la cepa silvestre y a la mutante 8A (GDH<sup>-</sup>), en exceso de amonio con acetato como fuente de carbono. La Fig. 5(B) muestra que estas cepas presentan un crecimiento similar en acetato. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en etanol, la actividad de GDH en la cepa silvestre está muy disminuida (Fig. 5 C); las actividades de GOGAT son menores a las encontradas en glucosa Tabla 2, esto podría sugerir que en esta condición el flujo de  $\alpha$ -cetoglutarato hacia la síntesis de glutámico es menor que en glucosa. Estos datos indican que cuando *S. cerevisiae* se cultiva en una fuente de carbono no fermentable la GDH, no juega un papel importante en la asimilación de amonio.

La Fig. 6, muestra las curvas de crecimiento de la cepa silvestre

S288C y de la mutante GDH<sup>-</sup> en limitación de glucosa, como se puede apreciar, ambas cepas presentan un crecimiento similar, este comportamiento sugiere que en esta condición la GDH tampoco juega un papel importante en la asimilación de amonio.

#### Efecto de algunos cetoácidos sobre la actividad de GDH-NADP.

En la Fig. 7 (A) se presenta el efecto de algunos cetoácidos sobre la actividad de la GDH-NADP. Como se puede ver el glioxilato y el malato son los inhibidores mas fuertes, mientras que el oxaloacetato, el isocitrato y el succinato ocupan una posición intermedia el piruvico no inhibe. Estas inhibiciones se obtuvieron disminuyendo la concentración de  $\alpha$ -cetogluturato que se utiliza para el ensayo (ver pié de figura). La Fig. 7 (B) presenta las inhibiciones que se observan cuando se utiliza la concentración habitual de  $\alpha$ -cetogluturato. En este caso, el glioxilato es nuevamente el mejor inhibidor, mientras que el málico, succinico y oxaloacetico inhiben a concentraciones mas elevadas; en esta condición el isocitrato inhibe muy poco y por supuesto el piruvato no inhibe. Estos datos sugieren que la inhibición que producen estos cetoácidos pudiera ser de tipo competitivo.

Tabla 1. Pozas intracelulares de  $\alpha$ -cetoácidos en la cepa silvestre S288C tratada con glioxilato.

	glioxilato	piruvato	$\alpha$ -cetoglutarato
MM T <sup>0</sup>	14.99	68.40	12.69
20'	11.61	51.44	9.61
60'	12.00	55.94	9.30
3H	4.44	15.20	4.16
6H	4.72	4.67	2.00
<hr/>			
MM + glioxilato			
20'	326.60	758.30	42.39
60'	532.12	1500.00	25.32
3H	264.11	940.00	18.84
6H	125.83	820.00	3.96

Las células se incubaron durante 2H en MM (T<sup>0</sup>); posteriormente el cultivo se dividió, y la mitad se trató con glioxilato (20mM). A los diferentes tiempos se tomó muestra de ambos cultivos, las células se lavaron con MM y los extractos se prepararon como se describe en Métodos (Artículo).

Tabla 2. Actividad específica de GOGAT en la cepa silvestre S288C y en la mutante 8A (GDH-NADP) cultivadas en acetato.

---

S288C	8A
.012	.018

---

Las células se cultivaron durante 30h en MM + 2 % de acetato de potasio. La actividad de GOGAT se determinó, siguiendo el método de Roon y Col. (1974).

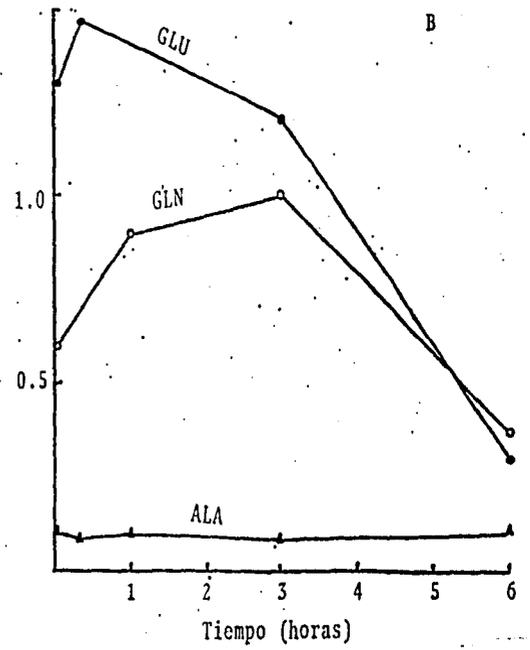
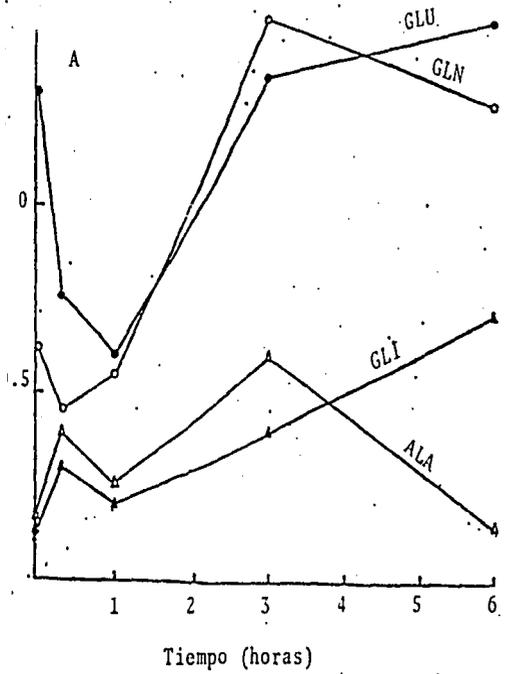


Fig. 1. Efecto de glioxilato sobre las pozas de aminoácidos. Las células se crecieron en MM durante 2H (T<sub>0</sub>). Posteriormente, el cultivo se dividió y la mitad se trató con glioxilato (A), la otra mitad no se trató (B).

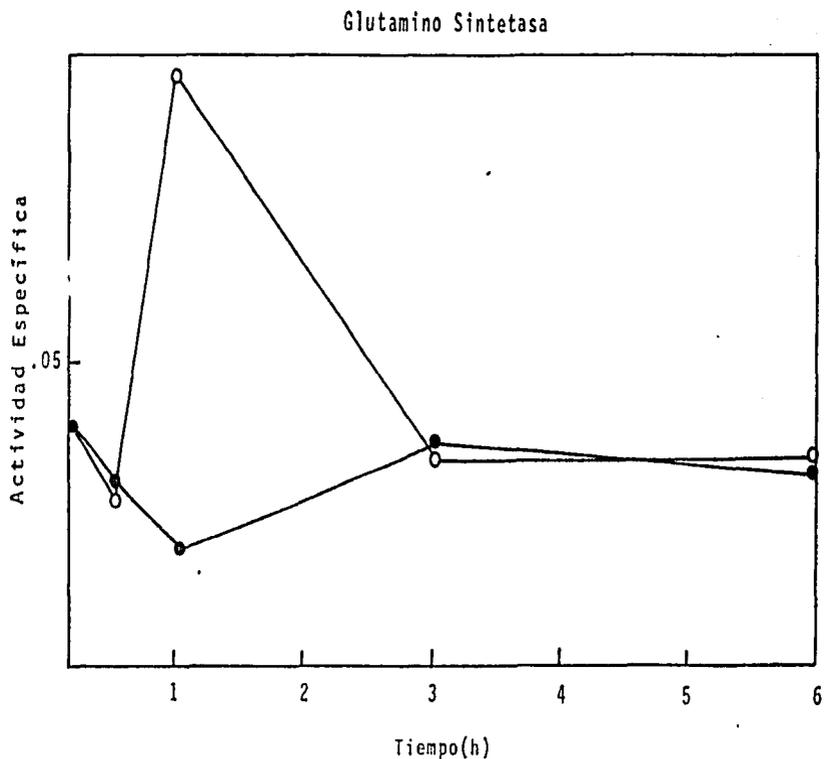


Fig. 2.- Efecto de gloxilato sobre la actividad específica de la glutamino sintetasa. Las células se crecieron en MM durante 2H ( $T_0$ ); posteriormente, el cultivo se dividió y la mitad se trato con gloxilato (o), la otra mitad no sufrió tratamiento (●). A diferentes tiempos se tomaron alicuotas y se determinó la actividad de glutamino sintetasa (Metodos Artículo). La actividad específica se expresa como umolas de  $\alpha$ -glutamil hidroxamato producidas/min/mg Proteino.

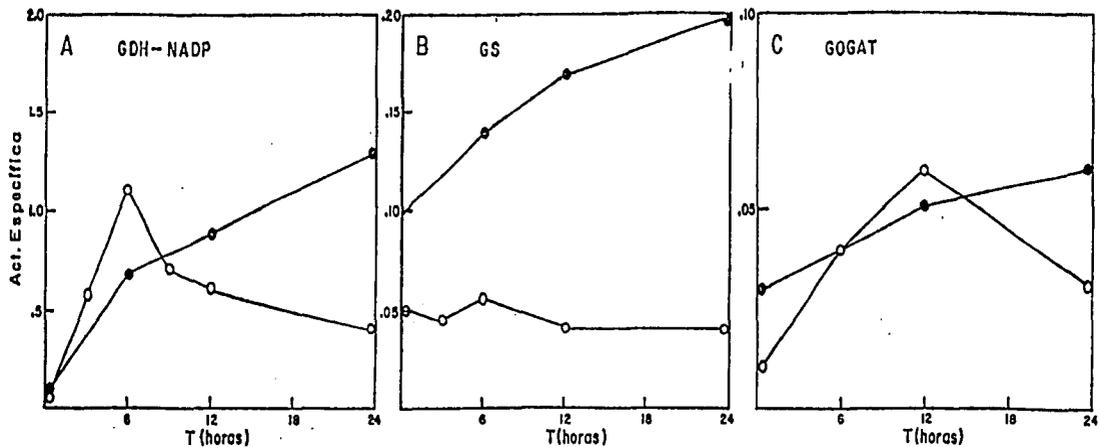


Fig. 3.- Actividad específica de GDH-NADP, GS y GOGAT. La cepa silvestre se cultivó en MM glucosa (○) y MM etanol (●) a diferentes tiempos se tomaron muestras para determinar la actividad de estas enzimas. La GDH-NADP y la GS se determinaron según métodos (Artículo); y la GOGAT, siguiendo el método de Roon y Col. (1974).

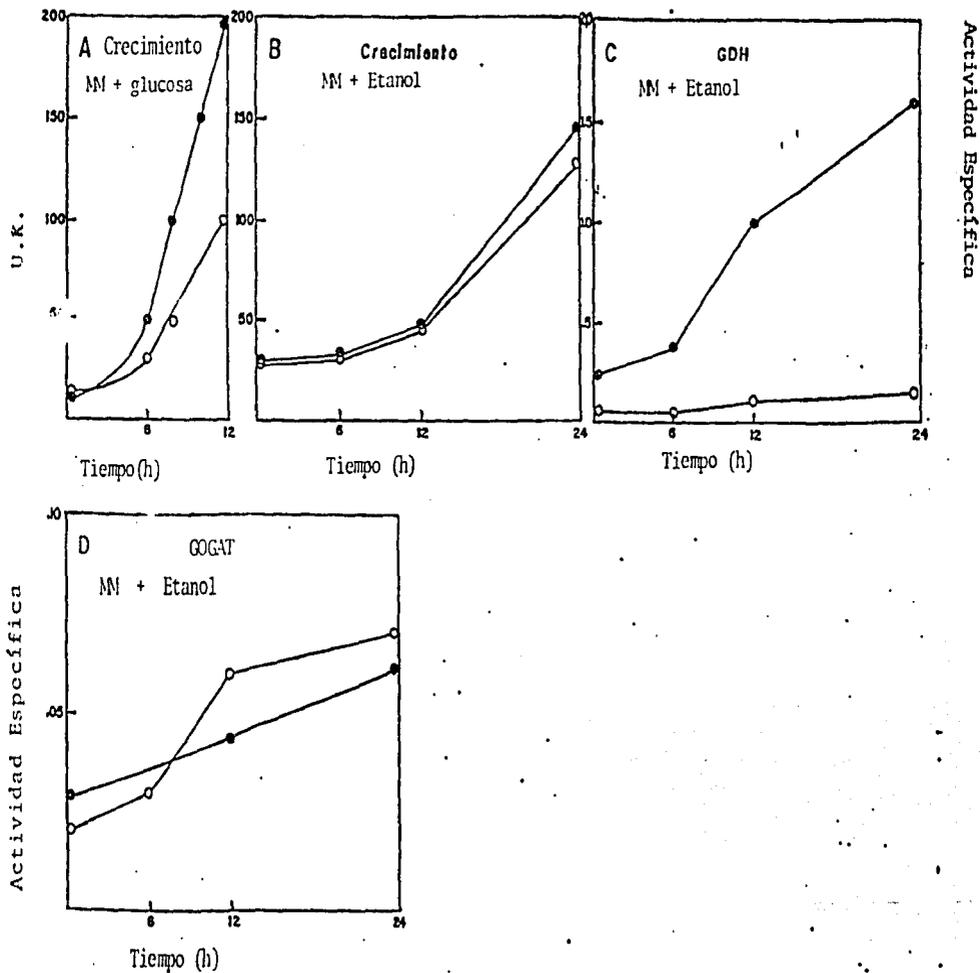


Fig. 1.- Crecimiento, actividad específica de GDH-NADP y GOGAT en la cepa silvestre S288C (●) y en la mutante 8A (GDH-NADP) (○).

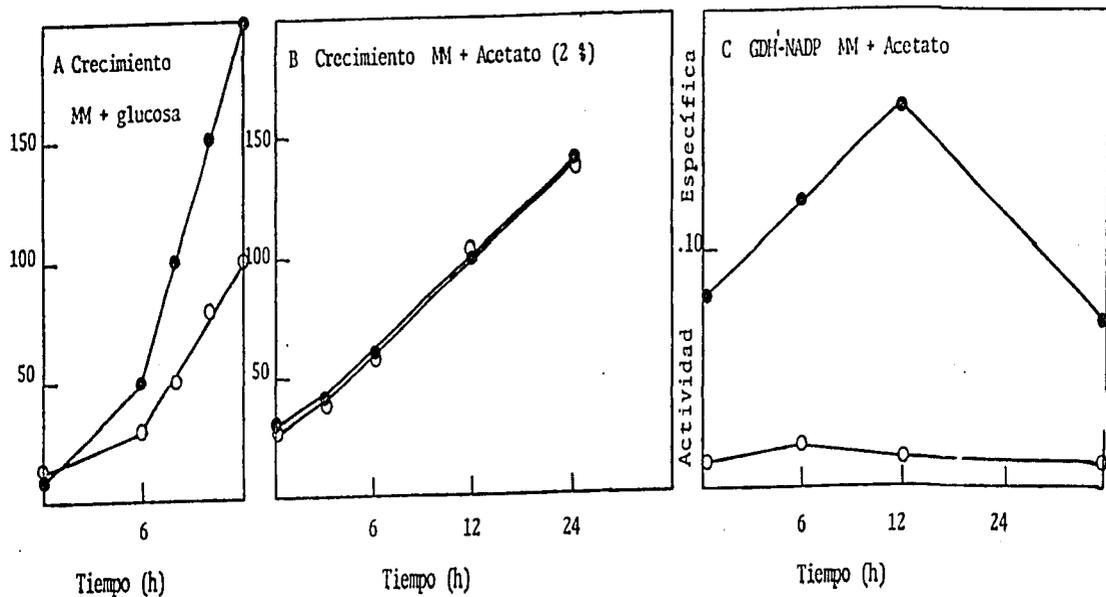


Fig. 5.- Crecimiento y actividad de GDH-NADP en la cepa silvestre S288C (●) y en la mutante 8A (GDH-NADP<sup>-</sup>) (○).

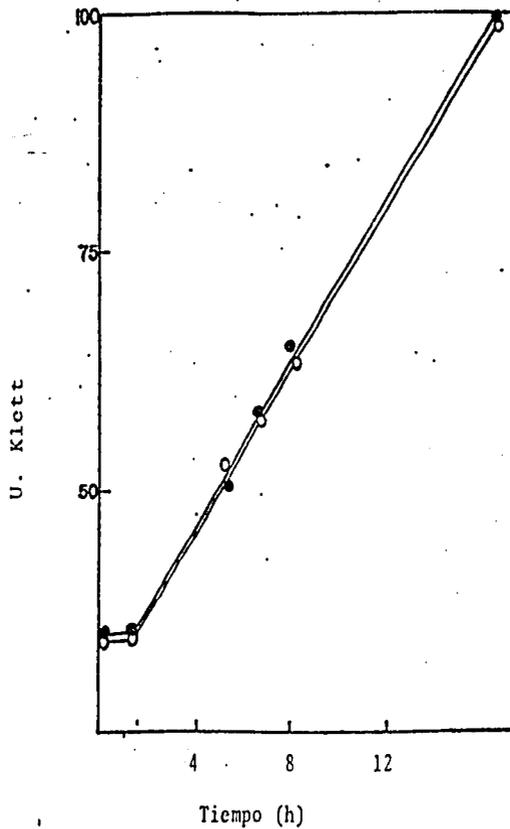


Fig. 6.- Crecimiento de la cepa silvestre S288C y de la mutante 8A (GDH-NADP) en cultivos limitados alimentados de glucosa (.03 $\mu$ m/ml/h).

- Glioxilato
- Malato
- ▲ Oxaloacetato
- △ Succinato
- Isocitrato
- Piruvato

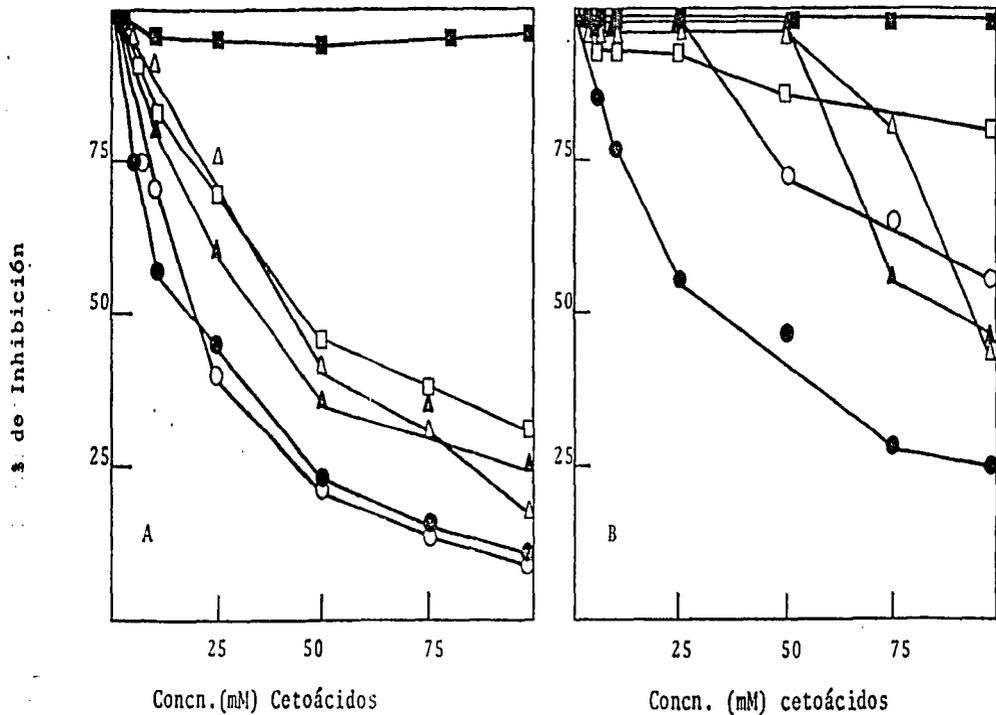


Fig. 7.- Inhibición de la actividad de GDH-NADP por diferentes cetoácidos.  
 A, para el ensayo de la GDH-NADP, se utilizó 5 veces menos  $\alpha$ -cetoglutarato que en B.

## DISCUSION

Cuando una levadura se cultiva en aerobiosis el ciclo de ácidos tricarbóxicos constituye la etapa final de la oxidación de esqueletos de carbono. Este ciclo cumple el papel dual de proporcionar energía e intermediarios metabólicos. El  $\alpha$ -cetoglutarato es uno de los intermediarios mas importantes que se producen como resultado de la operación de este ciclo. Como se menciona en la Introducción, la deshidrogenasa glutámica -NADP dependiente, cataliza la síntesis de ácido glutámico a partir de amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato. Por lo tanto, la asimilación de amonio, constituye el proceso metabólico en donde se reunen el metabolismo de nitrógeno y de carbono. En virtud de que en ciertas condiciones fisiológicas, el ciclo de ácidos tricarbóxicos representa el mecanismo más importante para la producción de energía, es evidente que la utilización de los intermediarios que se producen durante su funcionamiento, debe ser finamente regulada. Es decir, la naturaleza cíclica de esta vía metabólica no permite la utilización excesiva de intermediarios, sin que esto resulte en una disminución severa de la producción de energía.

En este trabajo se han presentado evidencias que indican que el glioxilato es un modulador negativo de la citrato sintasa y por lo tanto un modulador del flujo y de la concentración intracelular de intermediarios del ciclo. El catabolismo de glixilato procede por el ciclo de ácidos dicarbóxicos. En este ciclo participan las siguientes enzimas: malato sintasa, malato deshidrogenasa, fosfopi

ruvato carboxiquinasa, piruvato quinasa y piruvato deshidrogenasa, durante el funcionamiento de este ciclo, se consume glioxilato y se regenera acetil CoA (Kornberg, 1966). En presencia de glucosa, la actividad de casi todas las enzimas que participan en el ciclo del glioxilato no disminuye particularmente, inclusive la actividad de la malato deshidrogenasa es considerablemente alta (Polakis & Bartley, 1965). Solamente la actividad de la malato sintasa disminuye considerablemente (Polakis & Bartley, 1965). Esta enzima cataliza la condensación de acetil CoA y glioxilato, produciendo se malato. En estas condiciones, la inhibición de la citrato sintasa por glioxilato podría resultar en una elevación de la concentración de acetil CoA, que permitiera la síntesis de malato, aún en presencia de una baja actividad de malato sintasa. La inhibición de la citrato sintasa, seguramente resulta en una disminución en el flujo a través del ciclo de Krebs y por supuesto en una disminución de intermediarios. El hecho de que el glioxilato también reduzca la utilización de  $\alpha$ -cetoglutarato al inhibir a la GDH-NADP, podría verse como un mecanismo para equilibrar el consumo y la producción de este intermediario, de tal forma que se preservara el funcionamiento del ciclo de ácidos tricarbónicos, que en estas condiciones es el proveedor de energía. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que en estas condiciones la asimilación de amonio y la síntesis de ácido glutámico corren por cuenta de la vía GS-GOGAT. Dado que la GOGAT es una enzima de alta afinidad y poca capacidad esta proposición parece razonable. Las consideraciones que hemos presentado, nos han permitido propo

ner, que cuando *S. cerevisiae* se cultiva en fuentes de carbono no fermentables, condición fisiológica, en donde el ciclo de ácidos tricarboxílicos es el proveedor principal de energía e intermedios, el glutámico se sintetiza vía GOGAT, ya que la GDH-NADP, enzima de alta capacidad, podría depletar la poza de  $\alpha$ -ceto glutarato, interrumpiéndose así el aporte de energía e intermedios. Nuestros datos indican que este podría ser el caso, ya que una mutante alterada en la actividad de GDH-NADP, presenta un tiempo de duplicación igual al de la cepa silvestre, cuando ambas se cultivan en etanol o acetato. La actividad de GDH en la cepa silvestre cultivada en etanol es elevada; sin embargo, el hecho de que en esta condición esta cepa crezca igual que la mutante GDH<sup>-</sup> nos permite suponer que esta actividad pudiera estar inhibida *in vivo*. Arreguin & Kappeli (1987), han encontrado que en presencia de etanol, la actividad de la malato deshidrogenasa aumenta considerablemente; este aumento podría resultar en un incremento de la poza de oxaloacetato, que hemos encontrado inhibe a la GDH-NADP. Por otro lado, en esta condición, también se aumenta la actividad de la isocitrato liasa y malato sintasa (González, 1977) que dan como resultado la síntesis de glioxilato y succinato que también inhiben a la GDH-NADP. En acetato la actividad de la GDH-NADP está reprimida, y en esta condición es claro que la vía GS-GOGAT sería la responsable de asimilar amonio y sintetizar glutámico. Sin embargo, es interesante observar que en esta condición la actividad de GOGAT es baja. Esto podría sugerir que esta disminución en GOGAT pudiera formar parte del mecanismo de protec

ción de la poza de  $\alpha$ -cetogluturato. En relación a la naturaleza del efector que reprime la actividad de la GDH-NADP, Bogonez y Gól. 1985) han reportado que en acetato, la GDH-NADP se reprime debido a una acumulación excesiva de amonio, que de ser asimilado, depletaría la poza de  $\alpha$ -cetogluturato.

Aparentemente, existen diferentes mecanismos que mantienen baja la actividad de GDH-NADP; en etanol se inhibe y en acetato se reprime. Esta diferencia resulta interesante, ya que cuando *S. cerevisiae* se cultiva en glucosa, el etanol que se produce por fermentación, es excretado al medio y posteriormente es utilizado. En esta condición, la inhibición de la GDH-NADP por el propio etanol permitiría una adaptación rápida a esta nueva condición de crecimiento. En acetato, la represión sería un mecanismo más eficiente, ya que aparentemente esta es una fuente de carbono sumamente pobre y la represión de la GDH garantiza un control estricto del flujo de  $\alpha$ -cetogluturato hacia la síntesis de glutamato.

Cuando la levadura se cultiva en limitación de glucosa, la energía provendría de glicolisis y Krebs, ya que Brown y Johnson (1970), han reportado que en baja glucosa la fermentación es baja. En esta condición, nuevamente, el ciclo de ácidos tricarbóxicos resulta un importante generador de energía y por tanto, las pozas de intermediarios no deben ser desviadas a la síntesis de otros compuestos. Dado que en esta condición, la cepa silvestre y la mutante GDH<sup>-</sup> crecen con el mismo tiempo de duplicación, posiblemente esta enzima también esté inhibida.

Cuando se probó el efecto de diferentes cetoácidos sobre la activi

dad de GDH, se encontró que la mayoría de los intermediarios de Krebs y del ciclo del glioxilato inhiben; este hecho resulta interesante, ya que podría representar un sistema muy plástico. Es decir, en diferentes condiciones fisiológicas, varía la concentración de intermediarios y el hecho de que estos inhiban a la GDH, aseguraría un control más fino. Por otro lado la posibilidad de que esta inhibición fuera competitiva permitiría que esta regulación pudiera ser amortiguada por la poza intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato.

Finalmente, el hecho de que el piruvato no inhiba a la GDH permite, que en condiciones en donde el ciclo de Krebs no juega un papel como generador de energía, el flujo de  $\alpha$ -cetoglutarato se dirige hacia la síntesis de glutámico. En microarofilia por ejemplo, se acumula ácido pirurico.

Como se ha mencionado anteriormente, la función de la GOGAT solamente ha sido aclarada en algunos microorganismos (Tempest y Col. 1970; Loomnitz y Col. 1987). Nosotros proponemos que en *S. cerevisiae* la vía GS-GOGAT, juega un papel importante cuando la levadura se cultiva en exceso de amonio y en fuentes de carbono no fermentables, la función de esta vía sería la asimilación de amonio y de glutámico cuando el ciclo de ácidos tricarbóxicos es el principal proveedor de energía. Esta función no ha sido propuesta anteriormente. No se excluye la posibilidad de que la GOGAT también juegue un papel importante en exceso de glucosa, posiblemente similar al descrito para *N. crassa* por Lomnitz y Col. (1987).

Por otro lado, el hecho de que la actividad de GDH-NADP pueda ser inhibida por diferentes cetoácidos; permite suponer que en algu-

nos microorganismos, en donde se conoce que en limitación de amoníaco participa la GOGAT, la inhibición de la GDH sea el mecanismo que permita el funcionamiento alternativo de la vía GS-GOGAT VS GDH-GS.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

- 1.- El glioxilato regula coordinadamente el metabolismo de carbno y la asimilación de amonio.
- 2.- La vía GS-GOGAT es la encargada de asimilar amonio y sintetizar ácido glutámico en exceso de amonio y limitación de carbono; es decir cuando el ciclo de ácidos tricarboxílicos constituye la vía mas importante para generar energía.
- 3.- La actividad de la GDH-NADP es sensible a inhibición por cetoácidos.

## BIBLIOGRAFIA

Arreguín de Lorencez, M. and O. Kappeli, (1987) J. Gen. Microbiol. 133: 2517-2522.

Baldani, V. L. D. and J. Dokereiner. (1980)  
Soil. Biol. Biochem. 12: 433-439.

Bogonez, E. Salrustegui, J. and A. Machado.  
(1985) J. Gen. Microbiol. 131: 1425-1432

Bohannon, D.E., Rosenbrantz, M.S. and A.L.  
Sonenshein. (1985). J. Bacterial. 163: 957-964

Bravo, A. and J. Mora. (1988). J. Bacteriol (en prensa).

Brenchley, J.E., Prival, M.E. and B. Magasanik.  
(1973). J. Biol. Chem. 248: 6122-6128!

Brown, C.M. & C.M. Johnson. (1970).  
J. Gen. Microbiol. 64: 279-287.

Brown, C.M. (1976). A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans, &  
J. Melling (ed.). Continuous culture 6: applications and new fields.  
Ellis Horwood. Chichester, England. p 170-183.

Calderon, J. and J. Mora. (1985). J. Gen. Microbiol.  
131: 3237-3242.

Castaña, I., Bastarrachea, F. and  
A.A. Covarrubias. (1988) J. Bact. (en prensa).

Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J. and J. Mora.  
(1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 134-140.

Dean, D.R. and A.I. Aronson (1980). J. Bacterial  
141: 985-988.

Desphande, K.L. and J.F. Kane. (1980). Biochem  
Biophys. Res. Commun. 93: 308-314.

Deuel, T.F., Ginsberg, A., Yeh, J., Shelton, E.  
and E.R. Stadtman (1970) J. Biol. Chem. 245: 5195-5205.

Deuel, T.F. and S. Prusiner (1974). J. Biol.  
Chem. 249: 257-264.

Dokerty, D. (1970). Methods in Enzymology  
17: 850-856.

Drillien, R. and F. Lacroute. (1972). J. Bacterial.  
109: 203-209.

Dubois, E. and M. Grenson. (1974). Biochem  
Biophys. Res. Commun. 60: 150-155.

Folch, J. (1986) Tesis de Licenciatura. Unidad  
Académica de los ciclos Profesional y de  
Posgrado del C.C.H. UNAM.

Freese, E., Park, S.W. and M. Cashel (1964).  
Pore Natl Acad Sei 51: 1164-1172.

Fui Lin Pan and J.G. Coote (1979). J. Gen Microbiol  
112: 373-377.

García, E., Bancroft, S., Rhee, S.G. and  
S. Kustu. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1662-1670.

Garciarrubio, A., Lozoya, E., Covarrubias, A.A.  
and F. Bolivar. (1983). Gene. 26: 165-170.

González, A., Olivera, H., Rodríguez, L., Soberón, M.  
(1985) J. Gen. Microbiol. 135: 2565-2569.

González, E. (1977). J. Bacteriol. 129: 1343-1348.

Grenson, M., Dubois, E., and M. Piotroneska  
(1974). Mol. Gen. Genet. 128: 73-80.

Menning, S.B. and A. Ginsburg. (1971).  
Arch. Biochem. Biophys. 144: 611-620.

Hernández, G., Sánchez-Pescador, R., Palacios, R. and  
J. More. (1983). J. Bacteriol. 154: 524-528.

Hummeet, G. and J. Mora. (1980). Biochem. Biophys.  
Res. Commun. 96: 1688-1694.

Kanamori, K., Weiss, R.L. and J. D. Roberts.  
(1987). J. Bacteriol. 169: 4692-4695.

Kanamori, K., Weiss, R.L. and J. D. Roberts.  
(1987). J. Biol. Chem. 262: 11038-11045.

Kleiner, D., Phillips, S. and E. Fitzke. 1981.  
in H. Bothe and A. Trekst (ed.) Inorganic  
nitrogen and sulfur. Springer Verlag, Nun York.  
p, 131-140.

Kornberg, H.L. (1966). Essays in  
Biochemistry 2: 1-31.

Kusnan, M.B., Berger, M.G. and H.P. Fock. (1987).  
J. Gen. Microbiol. 133: 1235-1242.

Kustu, S., Burton, D., García, E., McCarter, L.  
and N. McFarland. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci.  
76: 4544-4550.

Lomnitz, A., Calderon, J., Hernandez, G. and J. Mora.  
(1987) 133: 2333-2340.

Lozoya, E., Sanchez-Pescador, R., Covarrubias, A.,  
Uichido, I. and F. Bolivar. (1980). J. Bacteriol. 144: 616-621.

Masters, D.S. and A. Meister. (1982).  
J. Biol. Chem. 257: 8711-8715.

Mazón, J.J. (1978). J. Bacteriol. 133: 780-785.

Meers, J.L. and D.W. Tempest, . (1970). J. Gen.  
Microbiol. 64: 187-194.

Miller, R.E. and E.R. Stadtman. (1972). J. Biol.  
Chem. 247: 7407-7419.

Mitchell, A.P., and B. Magasanik. (1983).  
J. Biol. Chem. 258: 119-124.

Mitchell, A.P. and B. Magasanik. (1984).  
Mol. Ceel. Biol.

Mora, V., Hernández, G. and J. Mora. (1987).

J. Gen. Microbiol. 133: 1667-1674.

Nagatani, H., Shimizu, J. and R.C. Valentine.

(1971). Arch. Microbiol. 79: 164-175.

Osburne, M.S. and E.R. Signer. (1980). J. Bacteriol.

143: 1234-1240.

Pakel, G. and B. Tyler. (1979). Proc. Natl. Acad.

Sci. 76: 4544-4550.

Pakel, G., Zelenetz, A.D. and B.M. Tyler. (1978).

J. Bacteriol. 133: 139-148.

Pateman, J.A. (1969) Biochem. J. 115: 769-783.

Patriquin, D.G., Dobereiner, J. and D.K. Jam (1983).

Can. J. Microbiol. 29: 900-915.

Polakis, E.S. & W. Bartley. (1965).

Biochem. J. 97: 284-297.

Romero, D. and G. Dávila. (1986). J. Bacteriol.

167: 1043-1047.

Roon, J.R., Harvey, L. and F.J. Larimore  
(1974). 118: 89-92.

Roon, R.J. and H.L. Even. (1978). J. Bacteriol.  
116: 36-40.

Sakamoto, N., A.M. Kotre and M.A. Savagean  
(1975). J. Bacteriol 124: 775-783.

Sánchez, F., Calva, E., Campomanes, M., Blanco, L.,  
Guzmán, J., Saborio, J.L. and R. Palacios.  
(1980). J. Biol. Chem. 255: 2231-2234.

Senior, P.J. (1975). J. Bacteriol. 123: 407-418.

Servín - González, L. and F. Bastarrachea (1984)  
J. Gen. Microbiol. 130: 3071-3077.

Shapiro, B.M. and E.R. Stadtman. (1968).  
J. Biol. Chem. 243: 3769-3772.

Tempest, D.W., J.L. Meers, and C.M. Brown. (1970).  
Biochem. J. 117: 405-407.

Westby, C.A., Enderlin, C.S., Steinberg, N.A.,  
Joseph, C.M. and J.C. Meeks. (1987). J. Bacteriol. 169: 4211-4214.

Wootton, J.C., Chambers, G.K., Holder, A.A., Baron, A.J.,  
Taylor, J.G., Finchem, J.R.S., Blumenthal, K.M.,  
Moon, K. and E.L. Smith. (1974) Proc. Natl. Acad.  
Sci. 77: 4361-4365.