



11261  
lej  
12

**Colegio de Ciencias y Humanidades**  
Unidad Académica de los Ciclos  
Profesional y de Posgrado

---

Centro de Investigación sobre Fijación  
de Nitrógeno  
Universidad Nacional Autónoma de México

**ASIMILACION DE GLUTAMINA EN**  
Saccharomyces cerevisiae

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Investigación Biomédica Básica

Presenta el Licenciado

**MARIO SOBERON CHAVEZ**

**FALLA DE ORIGEN**

1986



## **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.

## INDICE:

Introducción.....	1
Objetivos.....	8
Material y Métodos.....	10
Resultados.	
1. Aislamiento y caracterización de una mutante afectada en la degradación de glutamina.....	16
2. Actividad de glutaminasa en las cepas S288C y CN10.....	19
3. Regulación de la actividad de glutaminasa.....	21
4. La glutaminasa A es una enzima unida a membrana.....	22
5. Identificación de las enzimas de la vía de la $\omega$ -amidasa en <i>S. cerevisiae</i> .....	24
6. Regulación de la actividad de la transaminasa de glutamina por la fuente de nitrógeno.....	26
7. Efecto <i>in vivo</i> de la inhibición de la glutaminasa B por piruvato.....	27
8. Evidencias a favor de la participación de la vía de la $\omega$ -amidasa en condiciones microaerófilas....	29
9. Posible efecto de la acumulación de glutamina sobre el crecimiento.....	32
Discusión.....	34
Abreviaturas.....	40
Referencias.....	41
Tablas y Figuras.....	45

## INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento que forma parte de muchos compuestos simples y de casi todas las macromoléculas de los seres vivos; especialmente de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

La mayoría de los seres vivos pueden obtener el nitrógeno de diferentes compuestos como nitratos, amonio, aminoácidos, proteínas, etc. Sin embargo, la utilización de cualquiera de estas moléculas, implica su conversión a amonio, ya que este compuesto puede ser utilizado por la célula para la síntesis de compuestos nitrogenados.

El proceso mediante el cual el amonio es incorporado a moléculas orgánicas se conoce como asimilación. En este proceso, participan fundamentalmente la deshidrogenasa glutámica (GDH-NADP) y la glutamino sintetasa (GS). La GDH-NADP, cataliza la aminación reductiva del ácido 2-oxoglutarico dando como producto ácido glutámico:



La GS cataliza la producción de glutamina a partir de ácido glutámico y amonio, en esta reacción se gasta 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 (ácidos nucleicos, aminoácidos, aminoazúcares, etc), a través de donar sus grupos amino

y amido, mediante reacciones de transaminación y transamidación respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, la utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno, implica la degradación de estos compuestos hasta amonio. En este proceso participan diversas enzimas catabólicas, que están sujetas a un sistema de regulación denominado represión catabólica nitrogenada (1,2,3). Este mecanismo previene la expresión de estas enzimas en presencia de amonio, o de los productos primarios de la asimilación de este compuesto (ácido glutámico o glutamina) (4).

En algunos microorganismos se ha reportado que la glutamina es el correpresor de la represión catabólica nitrogenada (1, 3,5). La glutamina es por lo tanto, precursor de algunos compuestos nitrogenados y correpresor de la represión catabólica nitrogenada. Debido a que la glutamina tiene un doble papel en el metabolismo nitrogenado, su síntesis y degradación debe estar finamente regulada, manteniéndose una concentración de este aminoácido que cumpla las necesidades biosintéticas sin resultar en un efecto represivo.

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 cultivan en amonio y baja cuando la glutamina se utiliza como única fuente de nitrógeno (6,7). Por otro lado, en *Neurospora crassa*, la actividad de GS se regula a ni-

vel de la concentración y de la síntesis de esta enzima (9,10). En *S. cerevisiae*, al igual que en *N. crassa*, la actividad de GS también se regula a nivel de síntesis (11), y a nivel de actividad por un sistema de inactivación irreversible, probablemente proteolítico (11,12).

En diferentes sistemas celulares, se han encontrado diferentes actividades enzimáticas capaces de degradar glutamina: Transamidasas de glutamina, glutaminasas, vía de la  $\omega$ -amidasa y L-amino ácido oxidasa.

Las actividades más estudiadas, son las transamidasas de glutamina, que catalizan la donación del grupo amido de la glutamina a algún esqueleto de carbono, dando como productos glutamato y el esqueleto de carbono con un grupo amino. La mayoría de las transamidasas descritas, utilizan ATP como sustrato. Mediante reacciones de transamidación la glutamina participa en la síntesis de asparagina, NAD, purinas, glucosamina, citosina, carbomilfosfato, ácido p-amino benzoico, histidina y triptófano (13).

Como en otros microorganismos, el papel de las transamidasas de glutamina en *S. cerevisiae* parece ser notadamente biosintético, ya que estas enzimas están sujetas a inhibición por producto final (14,15,16,17). Además, se han aislado mutantes en algunas de estas actividades, en cepas de *S. cerevisiae*, las cuales presentan fenotipos de auxotrofia para los productos de transamidación específicos (18,19,20).

La glutamato sintasa (GOGAT) es una transamidasa de glutamina que cataliza la aminación reductiva del cetoácido 2-oxo-glutárico dando como resultado la producción de dos moléculas de ácido glutámico. El papel de la GOGAT ha sido estudiado en diferentes microorganismos; en *Klebsiella pneumoniae* se ha reportado que la actividad de GOGAT participa de manera importante, en la síntesis de glutámico como un sistema alternativo a la GDH (21); el funcionamiento de la GDH o la GOGAT, depende de la concentración intracelular de amonio (21). En *N. crassa*, se ha demostrado la participación de la GOGAT, en la síntesis de ácido glutámico en condiciones limitantes de amonio (22), además se ha demostrado un papel importante de la GOGAT en la asimilación de glutamina ya que dobles mutantes de *N. crassa* que carecen de esta actividad y de la GDH-NADP tienen un tiempo de duplicación mayor que la cepa silvestre, en glutamina como fuente de nitrógeno, en estas condiciones la poza intracelular de glutamato en la cepa mutante es menor (23).

La GOGAT de *S. cerevisiae* se ha purificado a homogeneidad, (24,25) aún cuando el papel fisiológico de esta enzima ha sido poco estudiado. Recientemente, se ha aislado una mutante de *S. cerevisiae* alterada en la actividad de GOGAT (Jorge Luis Folch, comunicación personal). Esta mutante se aisló buscando mutantes auxótrofas de glutámico, a partir de una cepa que carece de GDH-NADP. El estudio de esta mutante posiblemente permitirá determinar cual es el papel de la GOGAT en la asimilación de

amónio y glutamina en *S. cerevisiae*.

La actividad de glutaminasa cataliza la hidrólisis de glutamina dando como productos glutámico y amónio. La actividad de glutaminasa ha sido encontrada en diferentes tejidos de mamíferos (26,27,28). En mitocondria de cerebro de puerco se ha demostrado la existencia de dos glutaminasas, una soluble y la otra unida a membrana, estas dos actividades son activadas por fosfato (28). La actividad de glutaminasa se ha encontrado en diferentes microorganismos (29). En *Escherichia coli* y *Bacillus licheniformis* se ha demostrado la existencia de dos glutaminasas (30, 31). La actividad de glutaminasa ha sido encontrada en *S. cerevisiae* (32).

El papel de la actividad de glutaminasa en la asimilación de glutamina ha sido poco entendida por la ausencia de mutantes afectadas en esta actividad.

La actividad de transaminasa de glutamina cataliza la transferencia del grupo amino de la glutamina a algún  $\alpha$ -cetoácido dando como productos 2-oxoglutamato (cetoácido de glutamina) y un aminoácido; el 2-oxoglutamato es hidrolizado a amónio y 2-oxogluutarato mediante otra enzima llamada  $\omega$ -amidasa. La vía de degradación de glutamina por la transaminasa de glutamina y la  $\omega$ -amidasa se le conoce como la vía de la  $\omega$ -amidasa.

La vía de la  $\omega$ -amidasa ha sido estudiada en mamíferos donde se ha reportado la existencia de tres diferentes transaminasas de glutamina que difieren esencialmente en su especifici-

dad por diferente  $\alpha$ -cetoácido y su localización intracelular (33).

La actividad de transaminasa de glutamina se ha reportado en *N. crassa* (34). En este sistema se ha propuesto una vía metabólica en la que la degradación de glutamina a amonio y 2-oxoglutarato y la resíntesis de este aminoácido por la GDH y la GS resulta en un ciclo que incorpora amonio a aminoácidos (35). Esta vía se propuso para explicar la acumulación de arginina y otros aminoácidos en *N. crassa* cuando esta se encuentra en condiciones restringidas de crecimiento y que cepas que tienen algún bloqueo en la asimilación de amonio no pueden utilizar glutamina para la síntesis y acumulación de arginina (36). Además ha sido demostrada la participación de la transaminasa de glutamina en la asimilación de este aminoácido en *N. crassa* como lo sugiere la acumulación de 2-oxoglutarato *in vivo* cuando el hongo se crece en glutamina como fuente de nitrógeno y la inhibición por aminoxático (inhibidor-específico de transaminación) (23) de la excreción de amonio de una cepa mutante GDH<sup>-</sup> en glutamina como fuente de nitrógeno.

Otras enzimas que podrían participar en la degradación de la glutamina son las L-aminoácido oxidasas, que catalizan la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos. La L-aminoácido oxidasa de *Neurospora crassa* es capaz de desaminar a la glutamina con una actividad 50% menor que la que presenta con la histidina, que es el mejor sustrato de esta enzima (52); sin

embargo parece que la L-aminooxidasasa tiene poca participación en la asimilación de glutamina en este hongo ya que se ha reportado que esta enzima se reprime en presencia de glutamina (53).

**OBJETIVO.**

*Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar diferentes compuestos como fuente de nitrógeno (aminoácidos, bases puricas y pirimidicas, etc) (37) y la utilización de estos compuestos implica su degradación a ácido glutámico y amonio, precursores en la síntesis de glutamina para así distribuir el nitrógeno de estos dos aminoácidos a todos los compuestos nitrogenados.

Entre los aminoácidos que *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como fuente de nitrógeno se encuentra la glutamina, sin embargo la utilización de este aminoácido no implica necesariamente su degradación a amonio ya que, como se mencionó antes, al donar su grupo amido mediante reacciones de transamidación forma ácido glutámico.

En *S. cerevisiae* se ha reportado la existencia de la actividad de glutaminasa que hidroliza la glutamina dando como productos ácido glutámico y amonio (32). También en *S. cerevisiae* se ha reportado la existencia de la actividad de  $\omega$ -amidasa, que hidroliza  $\alpha$ -cetoglutaramato (cetoácido de glutamina) a cetoglutarato y amonio (33); sin embargo no se ha reportado la existencia de la transaminasa de glutamina, primera enzima de la vía de la  $\omega$ -amidasa, en este microorganismo.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el papel de las vías metabólicas que degradan la glutamina a amonio (glutaminasa y vía de la  $\omega$ -amidasa) durante la asimilación de este

aminoácido en *Sacharomyces cerevisiae*, con el fin de entender el papel que juegan estas enzimas en la distribución del nitrógeno de este compuesto, ya que la glutamina es uno de los principales donadores de nitrógeno celular.

## Material y Métodos

Cepas: Todas las cepas utilizadas provienen del cepario de los laboratorios de Cold Spring Harbor, Nueva York

Las cepas utilizadas son la cepa silvestre S288C:α mal; gal 2, la cepa AH22: leu 2-3; leu 2-112, his 3; y la cepa D286-A: ade 1; his 1.

### Medios de cultivo y condiciones de crecimiento:

Para el crecimiento de precultivos se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1%, Peptona de Caseína 2% y Dextrosa 2%). El medio mínimo utilizado se preparó con sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de Difco Yeast Nitrogen Base. La dextrosa se utilizó como fuente de carbono al 2%. Como fuente de nitrógeno se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 40mM 0.1% de glutamina. Los demás aminoácidos utilizados se ocuparon a la misma concentración de la glutamina. Las células se incubaron a 30°C y 175rpm y el crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 650nm. Para las determinaciones de pozas de aminoácidos y de actividades enzimáticas, las células se incubaron durante 12 horas.

### Mutagénesis y selección de mutantes:

La selección de mutantes, que no ocuparan glutamina como fuente de nitrógeno, fue de la siguiente manera: La cepa S288C se mutagenizó con ethylmetano sulfonato (EMS) siguiendo el método de Fink (38). Después de la mutagénesis se cultivaron las células en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno, durante tres días. Después de este período de tiempo, se enrique-

ció la población de células que no podían utilizar glutamina como fuente de nitrógeno, con el antibiótico N-glicosil-polifungina (39).

Las células se sembraron en cajas de medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno y se incubaron a 30°C durante 5 días. Las colonias que crecieron, se replicaron en cajas de medio mínimo, con glutamina como fuente de nitrógeno. Se purificaron aquellas células que no crecieron en glutamina como fuente de nitrógeno.

Determinación de pozas de aminoácidos.

Las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en 20ml de etanol al 60% y se hirvieron 10 minutos para evitar degradación de aminoácidos. Después de este tratamiento, las células se rompieron utilizando un homogenizador Braun y perlas de vidrio; la suspensión de células, se pasó por filtros millipore de 0.22 $\mu$ . Los filtrados que contenían los aminoácidos, se liofilizaron y las pozas de aminoácidos se determinaron como se ha descrito previamente (40).

Determinación de glutaminasa *in vitro*.

Se prepararon extractos solubles, rompiendo las células en teras en buffer Tris-HCl 50mM al pH apropiado, utilizando un homogenizador Braun y perlas de vidrio. Los extractos se centrifugaron 20 minutos a 10,000rpm y el sobrenadante se pasó por una columna de Sephadex G25, que se equilibró y eluyó con el buffer

de extracción. La actividad se ensayó en un volumen de 0.5ml con una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 50mM al pH apropiado, U-<sup>14</sup>C glutamina (10cpm por  $\mu$ mole) 60mM y 0.1ml de extracto crudo. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 50 minutos, la reacción se paró con 3ml de etanol frío al 80%. Esta mezcla se liofilizó, el residuo se resuspendió en HClO<sub>4</sub> al 3%. Se aplicó a papel Whatman 3MM y se cromatografió empleando como eluyente una mezcla de: 1-n butanol, ácido acético y agua (6:1:4).

Estándares no marcados, se corrieron paralelamente y se tiñeron con ninhidrina (1% en etanol). La radioactividad se estimó en el glutamato. Las unidades de actividad están expresadas como, nanomolas de glutamato producidas por minuto a 37°C.

#### Determinación de glutaminasa *in vivo*.

La actividad de glutaminasa *in vivo*, se midió siguiendo la producción de glutámico a partir de la poza intracelular de glutamina previamente marcada, en células crecidas en glutamina como fuente de nitrógeno, de la siguiente manera:

Las células se incubaron en medio mínimo con glutamina como única fuente de nitrógeno, hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 650mM. Las células se cosecharon por filtración y se concentraron 10 veces en medio mínimo con glutamina U-<sup>14</sup>C (10,000 cpm por  $\mu$ mola] 0.5mM y ácido aminoxacético 25mM, para evitar la degradación de glutamina por transaminación (23) (las células de la cepa CN10 se concentraron lo necesario, para

tener la misma densidad óptica que la cepa silvestre). La mezcla celular se incubó 5 minutos a 30°C para permitir la entrada de glutamina U-  $^{14}\text{C}$  y la glutamina marcada, se eliminó por filtración y lavados con glutamina fría 0.5mM. Se tomó parte de la mezcla celular para determinar la poza intracelular de glutamina y la cantidad de radioactividad en las pozas de glutamina y de glutámico, como se describió anteriormente.

La producción de glutámico, a partir de la poza intracelular de glutamina, se siguió en el resto de las células resuspendidas en medio mínimo conteniendo ácido aminoxacético 25mM, sin glutamina exógena. La mezcla celular se incubó 5 minutos a 30°C. Después de este período, las células se colectaron por filtración y la reacción se paró hirviendo las células durante 10 minutos en etanol al 80%, esta mezcla se filtró a través de filtros millipore de 0.22 $\mu$ . Los filtrados se liofilizaron y la cantidad de radioactividad en la poza de glutamato se determinó, como se describió anteriormente.

La actividad de glutaminasa se estimó a partir de la incorporación de glutámico  $^{14}\text{C}$  a la poza intracelular de glutámico previamente marcada, tomando en consideración la poza intracelular de glutamina.

Determinación de transaminasa de glutamina.

Se prepararon, extractos solubles, de la misma manera que los extractos utilizados para determinar la actividad de glutaminasa, excepto que el buffer utilizado para la extracción fué

50mM pirofosfato de sodio pH 8.5. La actividad de transaminasa de glutamina se determinó de tres maneras de la manera descrita: 1) midiendo la aparición del cetoácido de glutamina (2-oxo glutaramato) (23) 2) midiendo la desaparición de fenil piruvato (41) y 3) midiendo la aparición de fenilalanina (41).

La actividad acoplada de transaminasa de glutamina  $\alpha$ -amidasas se determinó siguiendo la producción de amonio a partir de glutamina que dependiera de la presencia de fenil piruvato (23). La concentración de amonio se midió con GDH bovina de la manera descrita (42).

#### Extracción de Metabolitos.

Para la determinación de pozas de glucosa, 2-oxoglutarato y piruvato, los extractos se prepararon de la manera descrita (43).

#### Determinación de 2-oxoglutarato, piruvato y glucosa.

La concentración de 2-oxoglutarato se determinó con GDH de bovino, siguiendo la oxidación de NADH a 340nM de la manera descrita (7). La concentración de piruvato se determinó con la enzima deshidrogenasa láctica (LDH) de bovino midiendo la oxidación de NADH a 340nM. Diferentes alícuotas de extracto se incubaron a temperatura ambiente con 0.1mM NADH y 0.01ml de una solución de LDH al 2.5% en un volumen final de 1ml de 100mM -- Tris-HCl pH7.8. La glucosa se determinó con un kit para determinar glucosa (God Perid, LaKesido).

**Determinación de proteína.**

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (44), utilizando albumina bovina como standar.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento y Caracterización de una mutante afectada en la degradación de glutamina.

A partir de la cepa silvestre (S288C), se buscaron mutantes incapaces de utilizar glutamina como única fuente de nitrógeno (ver material y métodos). Se aisló una mutante (CN10), que no crece en presencia de glutamina como única fuente de nitrógeno. La cepa CN10 tampoco crece cuando el medio de cultivo contiene glutamina y amonio como fuentes de nitrógeno (Fig.1A y B) y cuando esta mutante se cultiva en amonio como única fuente de nitrógeno, su tiempo de duplicación es tres veces mayor que el de la cepa silvestre cultivada en esta condición (Fig.1C). El fenotipo de esta mutante resulta paradójico, ya que además de ser incapaz de utilizar glutamina, aparentemente presenta problemas en la utilización de amonio.

La o las mutaciones presentes en la mutante CN10 pudieron haber afectado el transporte de glutamina, o alguna de las enzimas involucradas en la degradación de este amino ácido. En cualquiera de estos casos, la o las alteraciones presentes en la mutante CN10, resultan en un fenotipo complejo que aparentemente afecta la utilización tanto de glutamina como de amonio. 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. La cepa CN10 se cruzó con los

auxótrofos AH22 y D286-2A, (ver Material y Métodos) con ambas cepas se obtuvieron diploides capaces de crecer en glutamina como única fuente de nitrógeno, indicando que el fenotipo de la CN10 es recesivo; sin embargo, los diploides fueron incapaces de esporular y no fué posible llevar a cabo un análisis de segregación.

En virtud de estos resultados, se decidió analizar esta mutante midiendo diversos parámetros bioquímicos.

Si el fenotipo de la mutante CN10 se debe a una alteración en la degradación de glutamina, esto debería resultar en la acumulación de este amino ácido, cuando esta cepa se cultiva en presencia de glutamina en el medio de cultivo. Como se presenta en la tabla 1, la mutante CN10, acumula pozas de glutamina que son varias veces mayores que las encontradas en la cepa silvestre cuando esta se incuba en glutamina o glutamina mas amonio como fuente de nitrógeno. Es interesante observar, que la cepa silvestre tiene valores no detectables de glutamina cuando esta se utiliza como fuente de nitrógeno (Tabla 1), esto se debe a la rápida degradación de este aminoácido, ya que en períodos menores de incubación, este aminoácido si se encuentra presente (datos no mostrados).

Cuando la mutante CN10 se cultiva en amonio, acumula pozas de glutamina que son cuatro veces mayores a las que presenta la cepa silvestre en esta condición.

Esto podría significar que la mutante también presenta altera-

ciones en el metabolismo de la glutamina sintetizada endogenamente. Por otro lado, en la mutante parece haber una relación inversa entre la capacidad de acumular glutamina y la capacidad de crecer, ya que en amonio es la condición donde la cepa CN10 acumula menor poza de glutamina y mejor crece. (Fig. 1A, B, C) (Tabla 1).

Existen antecedentes que señalan que en ciertas condiciones fisiológicas, algunos hongos eucariotes son capaces de acumular amino ácidos, a pesar de existir mecanismos regulatorios que modulan el transporte y acumulación de estos compuestos. En el caso de *S. cerevisiae* Messeguey et al ( 54 ) han reportado, que cuando la síntesis de proteínas baja, muchos amino ácidos cambian su localización subcelular quedando atrapados dentro de una vacuola; a este respecto, este fenómeno podría explicar el hecho de que la mutante CN10 sea capaz de acumular pozas elevadas de glutamina.

Por otra parte, se podría esperar que mutantes incapaces de degradar glutamina presenten un requerimiento por ácido glutámico cuando se cultivan en glutamina como única fuente de nitrógeno.

En la Tabla 1 se presentan las pozas de glutamato encontradas en la cepa silvestre y en la mutante CN10 cuando estas se cultivan en glutamina, glutamina mas amonio. En esta tabla se puede observar que la cepa CN10 acumula pozas de glutamato 3 y 15 veces mas altas que la cepa silvestre cultivada en estas condi

ciones. Estos datos sugieren que aún cuando en estas condiciones, la glutamina no se está degradando igual que en la cepa silvestre, ya que la mutante CN10 no crece en estas condiciones y acumula glutamina, la incapacidad para degradar este aminoácido no es total, ya que a partir de este compuesto, la mutante puede obtener glutámico. Por otro lado, cuando estas cepas se cultivan en amonio como única fuente de nitrógeno, la cepa CN10 presenta pozas menores que las encontradas en la cepa silvestre (Tabla 1). Estos datos podrían indicar que la diferencia de crecimiento de la cepa CN10 en amonio como fuente de nitrógeno se pudiera deber a un requerimiento de glutámico, sin embargo este parece no ser el caso ya que estas diferencias en crecimiento no se modifican si se le agrega glutamato al medio de cultivo (datos no mostrados).

Los datos arriba mencionados, sugieren que la mutante CN10 está alterada en la degradación de glutamina, aun cuando la capacidad de utilizar este compuesto no está afectada en su totalidad.

Estos datos también muestran que la incapacidad que la mutante presenta para crecer en glutamina o en glutamina mas amonio no se debe a un requerimiento por ácido glutámico.

## 2. Actividad de glutaminasa en las cepas S288C y CN10.

Como se explicó en la introducción, existen varias enzimas responsables de la degradación de glutamina, con el fin de

analizar si alguna de estas actividades estaba alterada en la mutante CN10, decidimos iniciar este estudio determinando la actividad de glutaminasa en las cepas S288C y CN10. La actividad de glutaminasa se determinó *in vitro* e *in vivo* como se describe en la sección de material y métodos. Cuando la actividad de glutaminasa se midió *in vitro* no se encontraron diferencias entre la actividad de la cepa CN10 y la de la cepa silvestre (Tabla 2); sin embargo, cuando la actividad de glutaminasa se determinó *in vivo* se encontró que la cepa mutante CN10 presentaba una actividad que corresponde a un 16% de la que presenta la cepa silvestre, ver Tabla 2. Estos datos sugieren que el fenotipo de la mutante CN10 podría deberse a la inactivación *in vivo* de la glutaminasa. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que en el ensayo de glutaminasa "*in vivo*" se estuvieran determinando otras actividades que degradan la glutamina a glutamato (eg-transamidasa de glutamina).

Con el fin de seguir analizando el efecto de la mutación presente en la cepa CN10 sobre la actividad de glutaminasa, decidimos medir la actividad de esta enzima en un rango de pH's diferentes. Como muestra la figura 2, la cepa silvestre muestra 3 picos de actividad con pH óptimo a 7.5, 8.1 y 8.5, hemos denominado glutaminasa A al pico que aparece a un pH de 7.5 y glutaminasa B al pico que aparece a un pH de 8.1. El significado del tercer pico que presenta la cepa silvestre se discutirá mas adelante. La mutante CN10 presenta 2 picos de actividad de

glutaminasa con pH's optimos a 7.5 y 8.1. Cuando los extractos celulares de la cepa silvestre y de la cepa CN10 se calentaron 15 minutos a 60°C, la cepa silvestre retuvo los 2 picos de actividad mientras que la cepa CN10 perdió el pico correspondiente a la glutaminasa B. (Figura 2). Estos datos indican que en *S. cerevisiae* hay al menos dos glutaminasa (A y B fig. 2) y que la mutante CN10 presenta una actividad de glutaminasa B mas termosensible.

### 3. Regulación de la actividad de glutaminasa.

Hemos encontrado que la actividad de glutaminasa se regula negativamente por algunos  $\alpha$ -cetoácidos. La figura 3 muestra la inhibición de la actividad de glutaminasa por piruvato, 2-oxoglutarato y glioxalato. Ya que este experimento se llevó a cabo a un pH de 8.5, que no es el óptimo para ninguna de las glutaminasa, A y B estos datos no nos permiten saber cual de las dos enzimas se regula por cetoácidos; sin embargo se puede observar (Fig. 3), que la actividad de la cepa silvestre se inhibe por los  $\alpha$ -cetoácidos antes mencionados, aún cuando hay cierta activación de la enzima a concentraciones bajas de inhibidor. Este tipo de comportamiento se ha demostrado para otras enzimas sujetas a regulación alostérica (45). En la figura 3 también se puede observar que la actividad de glutaminasa (medida a pH 8.5) de la cepa CN10 es mas sensible a la inhibición por piruvato y 2-oxoglutarato, además se puede observar que la

actividad de la mutante no es estimulada a bajas concentraciones de piruvato y 2-oxoglutarato; en cuanto a la sensibilidad por glioxalato se puede ver que no hay diferencias entre la actividad de la cepa silvestre y la mutante.

Ya que las determinaciones arriba descritas se hicieron a pH 8.5, se decidió, medir la actividad de glutaminasa de la cepa CN10 en un rango de pH's utilizando 100mM de piruvato y por otro lado en extractos no dializados (Fig. 4A, B), esto con el fin de determinar si la inhibición por estos  $\alpha$ -cetoácidos era específica sobre la glutaminasa A o B. La Figura 4A, B, muestra que la actividad de glutaminasa B es menor en presencia de piruvato y en extractos no dializados en la cepa CN10. Es decir en extractos no dializados la actividad de glutaminasa B de la cepa CN10, posiblemente sea menor en virtud de que esta enzima sea mas sensible a la inhibición por cetoácidos presentes en el extracto. Estos datos sugieren que la inactivación de la glutaminasa B *in vivo* de la cepa CN10 podría deberse a una alta sensibilidad de la glutaminasa B a ciertos  $\alpha$ -cetoácidos.

#### 4. La glutaminasa A es una enzima unida a membrana.

Como se mencionó anteriormente, la cepa CN10 acumula pozas de glutamato que son varias veces mayores que las encontradas en la cepa silvestre cuando estos se cultivaron en presencia de glutamina (Tabla 1). Estos datos señalan que aún cuando

la glutamina no se está degradando en la mutante, con la misma eficiencia que en la cepa silvestre, parte de este aminoácido se cataboliza dando glutámico. Ya que la mutante CN10 no presenta alteraciones en la glutaminasa A, se pensó la posibilidad de que esta actividad estuviera unida a membrana y que fuera responsable de la degradación de glutamina exógena. Con el propósito de analizar la posible localización de la glutaminasa A en membrana, se midió la actividad de esa enzima a pH de 7.5 en los paquetes celulares obtenidos después de centrifugar cultivos crecidos en glutamina como fuente de nitrógeno y de romper las células mecánicamente, estos paquetes se trataron con triton X-100 .1%.

Los resultados de estas determinaciones se presentan en la Tabla 3, donde se puede observar que en la cepa silvestre se encontró un 57.8% de la actividad total en sobrenadante del extracto y el 42.1% en las pastillas tratadas con triton obtenidas después de centrifugar los extractos previamente rotos mecánicamente (ver Material y Métodos). Esta tabla también muestra que la actividad extraída del paquete celular depende de la presencia de Triton X-100; sin embargo existe algo de actividad (22.6%) que se puede extraer de los paquetes sin Triton. Resultados semejantes a los descritos se obtuvieron con la cepa CN10 (tabla 3). Estos datos sugieren que esta enzima está levemente unida a membrana.

Para poder distinguir cual de las dos glutaminasa (A ó B)

se estaba solubilizando con Triton X-100, se calentaron los paquetes celulares extraídos con este detergente 15 minutos a 60°C ya que como se mencionó antes la actividad de la glutaminasa B de la cepa CN10 es termosensible (figura 2). La tabla 3 muestra que la actividad extraída con Triton X-100 de los paquetes celulares corresponde a la actividad termoresistente, esto es, corresponde a la actividad de glutaminasa A. Estos datos indican que la actividad de glutaminasa A esta unida a membrana aunque la unión no es muy fuerte.

#### 5. Identificación de las enzimas de la vía de la $\omega$ -amidasa en *S. cerevisiae*.

La actividad de transaminasa de glutamina se determinó en la cepa silvestre crecida en amonio como fuente de nitrógeno. En la tabla 4 se reporta la estequiometría de la reacción de la transaminasa de glutamina. La estequiometría de la reacción se determinó utilizando al  $\alpha$ -cetoácido fenil piruvato como aceptor del grupo amino, y la reacción se midió de tres maneras: 1. midiendo la desaparición de fenilpiruvato, 2. midiendo aparición del cetoácido de glutamina (2-oxoglutamato) y 3. midiendo aparición de fenilalanina como se describe en la sección de material y métodos. Como se puede observar en la tabla 4, la actividad específica de la transaminasa de glutamina es la misma cuando se mide la actividad de las tres maneras descritas. Además se puede ver que en caso de las mediciones de

la desaparición de fenilpiruvato y de la aparición de 2-oxoglutarato la actividad es inhibida por aminoxacético inhibidor específico de transaminación y que además la reacción depende de la presencia de glutamina en el ensayo (tabla 4). También en la tabla 4 se puede observar que la reacción de transaminación de glutamina medida por la formación de 2-oxoglutarato es dependiente de la presencia de fenilpiruvato en el ensayo y DON el cual se ha reportado que inhibe la actividad de la  $\omega$ -amidasa de *Neurospora crassa* (23). Estos datos indican que la actividad de transaminasa de glutamina esta presente en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* está reportada la existencia de la actividad de  $\omega$ -amidasa (33). Sin embargo determinamos la actividad acoplada de la transaminasa de glutamina y la  $\omega$ -amidasa; esta reacción se midió determinando la aparición de amonio a partir de glutamina que fuera dependiente de la presencia de fenilpiruvato en el ensayo. Los resultados de esta determinación estan en la tabla 5 donde se puede ver que hay una actividad que corresponde a aproximadamente el 70% de la actividad de transaminasa de glutamina descrita en la tabla 4. Este dato indica que la actividad de  $\omega$ -amidasa esta presente en *S. cerevisiae*.

Por otra parte se midió la actividad de la transaminasa de glutamina utilizando diferentes  $\alpha$ -cetoácidos de manera de poder tener alguna idea sobre la participación de esta enzima en la síntesis de algunos aminoácidos. Los resultados de estas deter-

minaciones están en la tabla 6. Como se puede observar la transaminasa de glutamina puede utilizar diferentes  $\alpha$ -cetoácidos como sustratos, encontrándose la actividad mas alta con glio-xalato, lo que podría sugerir la participación de esta enzima en la síntesis de glicina. Es de hacerse notar que esta enzima utiliza como sustrato piruvato y glioalato que como se mencionó antes son inhibidores de la glutaminasa B, este dato sugiere que estas dos vías de asimilación de glutamina pudieran ser mutuamente excluyentes dependiendo de la disponibilidad de estos  $\alpha$ -cetoácidos.

6. Regulación de la actividad de la transaminasa de glutamina por la fuente de nitrógeno.

Se estudió la regulación de la actividad de la transaminasa de glutamina por la fuente de nitrógeno, de manera de poder tener una idea sobre la participación de esta enzima en el catabolismo de glutamina y/o en la síntesis de algunos aminoácidos. Para esto se cultivó a la cepa silvestre durante 12 horas en diferentes fuentes de nitrógeno y se determinó la actividad de la transaminasa de glutamina. Los resultados de estas determinaciones están en la tabla 7. Como se puede observar la transaminasa de glutamina se encuentra elevada en glutámico, glutámi-co mas amonio, glutamina y glutamina mas amonio.

Existe la posibilidad de que esta enzima esté regulada positivamente por glutámico, este no parece ser el caso ya que la ce

pa CN10 cultivada en amonio como fuente de nitrógeno, donde acumula pozas de glutamina elevadas y pozas menores de glutámico, presenta una actividad tres veces mayor que el de la cepa silvestre en la misma condición (dato no mostrado). Estos datos sugieren que la actividad de la transaminasa de glutamina podría ser regulada positivamente por glutamina.

Por otra parte los datos mostrados en la tabla 7 indican que la actividad de transaminasa de glutamina se reprime en presencia de lisina y glicina; esto podría sugerir que estos aminoácidos son sintetizados a travez de la transaminasa de glutamina ya que ademas sus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos son substratos de esta enzima (tabla 6).

#### 7. Efecto *in vivo* de la inhibición de la glutaminasa B por piruvato.

Como se mencionó antes la glutaminasa B es regulada negativamente por piruvato (figura 3) y este es ademas substrato de la transaminasa de glutamina. Estas caracterfsticas de este  $\alpha$ -cetoácido hacen interesante conocer la regulación de su concentración ya que esto puede determinar porque vía la glutamina es catabolizada.

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo aerobio facultativo, es decir que puede crecer independientemente de la presencia de oxígeno en el medio. Sin embargo la estrategia que utiliza *S. cerevisiae* para degradar la glucosa es diferente de pendiendo de la presencia de oxígeno en el medio; es decir en

presencia de oxígeno la glucosa es catabolizada hasta  $\text{CO}_2$  por la cadena respiratoria y en ausencia de oxígeno crece fermentativamente produciendo etanol. Dado que *S. cerevisiae* utiliza de manera diferente el carbono dependiendo de la oxigenación decidimos medir las pozas intracelulares de piruvato en condiciones de aeración y en microaerofilia en glutamina como fuente de nitrógeno en la cepa silvestre y en la cepa CN10. Como la tabla 8 muestra la concentración intracelular de piruvato aumenta cuando las células se cultivan en microaerofilia. Es de hacerse notar que la cepa CN10 presenta pozas de piruvato menores que las encontradas en la cepa silvestre cuando estas cepas se cultivan en aeración, estos datos se discutirán mas adelante.

Decidimos medir la actividad de glutaminasa con el ensayo *in vivo* en células cultivadas con aeración y en microaerofilia para determinar si había algún efecto de la acumulación de piruvato sobre la actividad de esta enzima. Como la tabla 9 muestra la actividad de glutaminasa no se pudo detectar en la cepa silvestre y en la cepa CN10 cuando estas se cultivan en glutamina como fuente de nitrógeno en microaerofilia. La actividad de glutaminasa se midió *in vitro* al pH óptimo de la glutaminasa B en la cepa silvestre en cultivos aerados y en microaerofilia. En la tabla 9 se puede observar que la actividad de glutaminasa es tres veces menor en microaerofilia que en cultivos aerados, además se hizo una mezcla de extractos entre los ex-

tractos provenientes de cultivos aerados y los provenientes de células cultivadas en microaerofilia, encontrándose una actividad dos y media veces menor que el valor esperado. Estos datos muestran que la actividad de glutaminasa B se encuentra inhibida cuando las células se cultivan en condiciones microaerofilicas y que esta inhibición se puede deber a la acumulación de piruvato ya que extractos provenientes de células incubadas en microaerofilia inhiben la actividad de extractos provenientes de células cultivadas en agitación.

Por otra parte hemos encontrado que la cepa CN10 es capaz de utilizar glutamina como fuente de nitrógeno con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre cuando se cultiva en condiciones microaerofilicas (figura 5); además hemos encontrado que el 35% de las revertantes aisladas de la cepa CN10 que ahora pueden utilizar glutamina como fuente de nitrógeno son mutantes incapaces de respirar (fenotipo "petite"). Estos datos sugieren la participación de otro sistema de degradación de glutamina en condiciones microaerofilicas ya que aun la cepa silvestre puede crecer óptimamente en glutamina como fuente de nitrógeno en estas condiciones a pesar de tener inhibida la glutaminasa B (tabla 9). Este sistema de asimilación de glutamina podría ser la vía de la  $\omega$ -amidasa ya que la transaminasa de glutamina utiliza piruvato como sustrato (tabla 6).

B. Evidencias a favor de la participación de la vía de la  $\omega$ -amidasa en el catabolismo de glutamina en condiciones micro-



nitrógeno y que fuera incapaz de respirar (cepa rM2-3). A partir de esta revertante *petite* aislamos cinco mutantes que son incapaces de utilizar glutamina como fuente de nitrógeno y que son capaces de crecer en amonio como fuente de nitrógeno. En la tabla 11 se pueden ver las actividades de estas cinco cepas de la actividad acoplada de la transaminasa de glutamina  $\omega$ -amidasa. Como se puede observar tres de las cinco mutantes no tienen actividad detectable de liberación de amonio a partir de glutamina dependiente de glioxalato mientras que otra mutante presenta solo el 25% de esta actividad (tabla 10). Para determinar cual de las dos enzimas de la vía de la  $\omega$ -amidasa estaba afectada, medimos la actividad de transaminasa de glutamina con glioxalato como aceptor del grupo amino en presencia y ausencia de DON que como se mencionó antes es inhibidor de la  $\omega$ -amidasa de *N. crassa* (23) y cuya presencia es necesaria en el ensayo de formación de 2-oxoglutarato (tabla 4). Como la tabla 10 muestra las cinco mutantes aisladas presentan actividad de transaminasa de glutamina, sin embargo las cuatro mutantes afectadas en la actividad acoplada de transaminasa de glutamina  $\omega$ -amidasa, no se observa ningún efecto en la actividad por la ausencia del inhibidor DON. Estos datos sugieren que las cuatro mutantes aisladas están afectadas en su actividad de  $\omega$ -amidasa, aunque es necesario medir directamente la actividad de esta enzima para corroborar estos datos.

### 9. Posible efecto de la acumulación de glutamina sobre el crecimiento.

Como se mencionó antes la cepa CN10 es incapaz de utilizar glutamina como fuente de nitrógeno cuando se cultiva en condiciones de aeración. En esta condición la cepa CN10 acumula una poza de glutamina mucho mayor que el encontrado en la cepa silvestre (tabla 1) y es capaz de acumular glutamato lo que sugiere que la falta de crecimiento no se debe a un requerimiento de glutámico.

En *Bacillus subtilis* se ha reportado que auxótrofos de glutamina cuando se cultivan en glutamina como fuente de nitrógeno acumulan este aminoácido y tienen disminuida su capacidad de catabolizar glucosa (46). En este sistema la disminución en la capacidad de asimilar glucosa se puede deber a la ausencia de la glutamino sintetasa o a la acumulación de glutamina.

Con este antecedente decidimos estudiar la posibilidad de que la acumulación de glutamina encontrada en la cepa CN10 tuviera un efecto sobre la degradación de glucosa. Con este objetivo medimos las pozas intracelulares de glucosa, piruvato y 2-oxoglutarato en las cepas CN10 y la cepa silvestre cultivadas en glutamina como fuente de nitrógeno. Como la tabla 12 muestra la cepa CN10 acumula una poza de glucosa 17 veces mayor que la encontrada en la cepa silvestre, en cuanto a las pozas de piruvato y 2-oxoglutarato estas son 3 y 4 veces mas bajas en la cepa CN10. El efecto encontrado en la degradación de glucosa no

se debe a la falta de crecimiento ya que la cepa silvestre en un medio sin fuente de nitrógeno no acumula glucosa y presenta unas pozas de piruvato y 2-oxoglutarato similares a las encontradas cuando esta se cultiva en glutamina como fuente de nitrógeno (tabla 12).

Por el momento estamos tratando de identificar el posible bloqueo. Datos preliminares sugieren que el flujo de carbono esta inhibido a nivel de la enzima piruvato kinasa ya que la cepa CN10 tiene actividades de esta enzima 2 veces menores a las encontradas en la cepa silvestre cuando estas se cultivan en glutamina como fuente de nitrógeno (tabla 13). Por otra parte hemos encontrado que la actividad de piruvato kinasa de la cepa silvestre es regulada negativamente por glutamina, (figura 7), sin embargo es necesario caracterizar mejor esta inhibición para saber si es específica de glutamina y medir pozas de fosfoenol piruvato para tener una idea mas precisa si el bloqueo en el flujo de carbono se debe específicamente a la inhibición de piruvato kinasa.

## DISCUSION

En este trabajo, hemos estudiado la participación de la actividad de glutaminasa y de la vía de la  $\omega$ -amidasa en la asimilación de glutamina en *S. cerevisiae*.

Nuestros resultados indican que *S. cerevisiae*, posee dos actividades de glutaminasa con diferentes pH's óptimos (glutaminasa A y B). Estas dos actividades se encuentran en diferentes compartimentos celulares, ya que la actividad de glutaminasa A esta asociada a membrana y la glutaminasa B es una enzima soluble.

En otros sistemas celulares se ha descrito la existencia de dos glutaminasas como organismos procariotes (30,31) y células de mamífero (28). En células de mamífero se ha encontrado que una de estas dos glutaminasas se encuentra asociada a membrana (28). El posible papel de tener una glutaminasa asociada a membrana es el de regular la poza intracelular de glutamina ya que esta en vez de ser transportada como glutamina es transportada como glutamato.

Hemos encontrado que la actividad de glutaminasa B se regula negativamente por  $\alpha$ -cetoglutarato, piruvato y glioxalato. El papel de esta regulación negativa se discutirá mas adelante con respecto a los datos obtenidos con la actividad de transaminasa de glutamina, ya que el posible papel de esta regulación es el de evitar que la poza intracelular de glutamina se hidrolize a glutamato y amonio para que esta sea utilizada en

la síntesis de glutamato, alanina y glicina.

Para el estudio del papel de la actividad de glutaminasa aislamos una mutante que no puede utilizar glutamina como fuente de nitrógeno. Esta cepa (CN10) presenta una actividad de glutaminasa B mas termosensible y mas sensible a la inhibición por  $\alpha$ -cetoglutarato y piruvato. Estos datos sugieren que la baja actividad (16%) de glutaminasa de la cepa CN10 en los ensayos *in vivo* pudiera deberse a la mayor sensibilidad de esta enzima al efecto de los cetoácidos; ya que extractos no dializados de esta mutante, no presentan actividad *in vitro* de glutaminasa B.

La actividad de glutaminasa B tiene un papel importante en la regulación de las pozas intracelulares de glutamina, ya que la cepa CN10 acumula glutamina aun en amonio como fuente de nitrógeno a pesar de tener una actividad de glutamino sintetasa cuatro veces menor que la encontrada en la cepa silvestre (dato no mostrado). Por otra parte la cepa CN10 acumula unas pozas de glutamato varias veces mayores que las encontradas en la cepa silvestre solo en presencia de glutamina exogena, lo que sugiere que la actividad de glutaminasa A esta asociada a la membrana plasmática.

La falta de crecimiento de la cepa CN10 no se debe a falta de ácido glutámico sino a la acumulación de glutamina. El posible efecto de la glutamina sobre el crecimiento puede deberse a que este aminoácido regula negativamente la utilización de glucosa como fuente de carbono, sin embargo no hemos exclu-

do la posibilidad de que el crecimiento celular esté reprimido a otro nivel además de la utilización de glucosa. La regulación de la asimilación de glucosa parece ser a nivel de la enzima piruvato kinasa, ya que esta enzima se inhibe por glutamina; sin embargo es necesario caracterizar mejor esta inhibición para de terminar si es específica de glutamina. Pensamos que la razón de la regulación negativa de la actividad de la piruvato kinasa por glutamina es el de regular la poza intracelular de glutamina ya que esta enzima es la responsable de la síntesis de piruvato, el cual regula negativamente la actividad de glutaminasa B.

Como se mencionó en la introducción, la vía de la  $\omega$ -amidasasa es una ruta importante en la asimilación de glutamina en *Neurospora crassa* (23). En esta vía participan la transaminasa de glutamina y la  $\omega$ -amidasasa. Nuestros datos indican que la actividad de la transaminasa de glutamina en *S. cerevisiae* se regula positivamente por glutamina y negativamente por lisina y glicina, lo que sugiere que esta enzima participa en el catabolismo de glutamina y/o en la síntesis de lisina y glicina.

*Saccharomyces cerevisiae* como otros hongos sintetiza lisina a través de la conversión del ácido homocítrico a  $\alpha$ -ceto adipato el cual mediante una reacción de transaminación forma  $\alpha$ -amino adipato intermediario en la biosíntesis de lisina (47). En levadura se han reportado dos actividades de transaminasas que catalizan la conversión de  $\alpha$ -ceto adipato a  $\alpha$ -amino adipato

utilizando ácido glutámico como donador del grupo amino, sin embargo estas dos enzimas no presentan ningún cambio de actividad en presencia de lisina en el medio (48). Una de estas dos transaminasas aumenta su actividad en presencia de  $\alpha$ -aminoadipato en el medio de cultivo lo que sugiere su participación en la desaminación de este aminoácido mas que en la síntesis de lisina (48).

La biosíntesis de glicina en *S. cerevisiae* procede a través de la conversión de serina a glicina por una hidroximetil transferasa de serina (49). Sin embargo existe una vía alterna para la síntesis de glicina en la cual el cetoácido de este aminoácido (glioxalato) se sintetiza a partir de isocitrato; el glioxalato es posteriormente transaminado para formar glicina. Esta vía funciona cuando la levadura se cultiva en fuentes de carbono no fermentables (50). Por otra parte se reportó que el aminoácido responsable de la donación del grupo amino para la síntesis de glicina es alanina, ya que este aminoácido presenta una mayor actividad de transaminación con glioxalato a comparación de otros aminoácidos incluyendo glutamina (51). Los datos mencionados sugieren que la transaminasa de glutamina no tiene un papel fundamental en la síntesis de lisina y glicina ya que existen otros aminoácidos capaces de donar su grupo amino para la biosíntesis de lisina y glicina. El aislamiento de una mutante permitirá determinar el papel de esta enzima en la síntesis de lisina, glicina y otros aminoácidos.

Por otra parte encontramos que la transaminasa de glutamina utiliza como substratos a los cetoácidos glioxalato, piruvato, que como se mencionó antes son inhibidores de la actividad de glutaminasa B. Esto sugiere que la operación de estas dos vías para asimilar glutamina es excluyente y depende de la concentración intracelular de estos cetoácidos.

Es interesante notar que el  $\alpha$ -cetoglutarato es un inhibidor de la glutaminasa B y no es sustrato de la transaminasa de glutamina; sin embargo este cetoácido es sustrato de la GOGAT, lo que sugiere que el funcionamiento de la actividad de glutaminasa B y de GOGAT, depende de la concentración intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato.

En cuanto a la regulación de la concentración de glioxalato intracelular se sabe que este solo se sintetiza cuando la levadura se cultiva en fuentes de carbono no fermentables (50), lo que sugiere que en estas condiciones la glutamina es catabolizada esencialmente por la transaminasa de glutamina.

Nuestros datos muestran que piruvato se acumula en condiciones microaerofílicas dato que podemos relacionar con la baja actividad de glutaminasa B encontrada en estas condiciones. Por otra parte tenemos algunas evidencias que sugieren la participación de la vía de la  $\omega$ -amidasas en condiciones microaerofílicas como son: 1.- El hecho que la mutante CN10 (afectada en la glutaminasa B) crece con el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre en glutamina como fuente de nitrógeno en microaerofilia; 2.- El crecimiento de la mutante CN10 en glutamina como

fuelle de nitrógeno en ciertas condiciones de microaerofilia es parcialmente inhibido por lisina. 3.- La inhibición de la transaminasa de glutamina por lisina es menor en microaerofilia. 4.- El aislamiento de 4 mutantes que no pueden utilizar glutamina como fuente de nitrógeno en microaerofilia, las cuales parecen estar afectadas en la actividad de  $\omega$ -amidasa.

En base a estos datos proponemos que la glutamina es asimilada por la actividad de glutaminasa B en fuentes de carbono fermentables y en presencia de oxígeno, mientras que la vía de la  $\omega$ -amidasa participa en condiciones microaerofílicas. La regulación de la participación de estas dos vías depende de la concentración intracelular de piruvato, que como se mencionó antes, es un inhibidor de la actividad de la glutaminasa B y a su vez sustrato de la transaminasa de glutamina. En la figura 8 se muestra un esquema de la participación de las glutaminas A y B y de la vía de la  $\omega$ -amidasa en *S. cerevisiae* dependiendo de las condiciones aeróbicas del cultivo.

**Abreviaturas**

**DON** - 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina

**MM** - medio mínimo

**SN** - medio mínimo sin fuente de nitrógeno

**Gln** - glutamina

**rpm** - revoluciones por minuto

**nm** - nano metros

## REFERENCIAS

1. Dubois, E., S. Vissers, M. Grenson, y J.M. Wiame. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun 75: 233-239.
2. Dunn-Coleman, N.S., y R.H. Garret. (1980) Mol. Gen. Genet. 179: 25-32
3. Van de Poll, K.W. (1973). FEB Lett. 32: 265-266.
4. Marzluff, G.A. (1981) Microbiol. Rev. 45: 437-461
5. Dunn-Coleman, N.S., A.B. Tomsett, y R.H. Garret (1979). J. Bacteriol. 139: 697-700
6. Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, y J. Mora (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 134-140.
7. Dubois, E.L. y M. Grenson (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 150.
8. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva y J. Mora. (1982). J. Bacteriol. 150: 105-112.
9. Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, y J. Mora. (1978). J. Gen. Microbiol. 106: 251-259.
10. Quinto, C., J. Mora y R. Palacios (1977) J. Biol. Chem. 252: 8724-8727.
11. Legrain, C.S. Vissers, E. Dubois, M. Legrain y J.M. Wiame (1982). Eur. J. Biochem. 123: 611-616.
12. Mitchell, A.P. y B. Magasanik. (1984). J. Biol. Chem. 259: 12054-12062.
13. Tate, S.S. y Meister A. (1973) Academic Press Inc New York, Prusiner S. Y Stadman E. R. E. J. pp. 77-127.
14. Satyanarayana, T., H.E. Umbarger y G. Lindergren (1968) J. Bacteriol. 96: 2012.

15. Lacroute, F. (1968) J. Bacteriol. 95: 827
16. Ramos, F. y J. M. Wiame. (1980). Arch. Inst. Physiol. Biochim 88: 1396.
17. Lingens, F., W. Goebel y H. Vesseler (1967) Eur. J. Biochem 1: 363
18. De Moss, J. (1965) Biochem. Biophys Res. Commun. 18: 850
19. Lomax, C.A. y R.A. Woods (1973) Mol. Gen. Genet. 120: 139
20. Grenson, M. (1969) Eur. J. Biochem. 11: 249.
21. Senior, P.J. (1975). J. Bacteriol. 123: 407-418.
22. Hummelt, G., y J. Mora (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun 92: 127-133
23. Calderon, J. E. Morett y J. Mora. (1985) J. Bacteriol. 161: 807-809.
24. Masters Jr., D.S. y A. Meister (1982) J. Biol. Chem. 257: 8711-8715.
25. Roon, R.J., H.L. Even y F. Larimore (1974) J. Bacteriol. 118: 89
26. Joseph, S.K. y J. D. Mc Givan (1978) Biochem. J. 176: 837-844.
27. McGivan, J. D., J.H. Lacey y S.K. Joseph (1980). Biochem 192: 537-542.
28. Nimmo, G.A. y K.F. Tipton. (1981). Biochem. Pha-masol. 30: 1635-1641.
29. Imada A., K. Igarasi, K. Nakahama y M. Isono (1973) J. Gen. Microbiol. 76: 85-99
30. Hartman, S.C. (1968). J. Biol. Chem. 243: 853-863.
31. Cook, W.R., J.H. (1981). J. Bacteriol. 148: 365-367

32. Averman, T.L., T.G. Generalova, I.V. Polotskaya, y M.A. Polotskii (1981) *Appl. Biochem. Mic.* 17: 119-121.
33. Cooper, A.J.L. y A. Meister (1977). *Crit. Rev. in Biochem* 4: 251-267.
34. Monter, C., Meister, A. (1958) *Neurospora*, *Biochem. Biophys. Acta.* 28: 202-203.
35. Espín, G. Palacios, R. Mora, J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 115: 59-68.
36. Mora, Y., Espín, G., Willms, K., Mora, J. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 104: 241-250.
37. Cooper, T.G. In *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Metabolism and Gene Expression* (Eds. J. N. Straltem, E.W. Jones. J.B. Broach) p. 39.1982.
38. Fink, G.R. (1970) *Methods in Enzimology* 17: 59-78
39. Polaina, J.A. y J. Conde (1981) *Mutation Research* 91: 111-114.
40. González, A., M. Tenorio, G. Vaca y J. Mora (1983) *J. Bacteriol.* 155: 1-7.
41. Cifioer, A.J.L. (1978) *Anal. Biochem.* 89: 451-460.
42. White, C. (1970) *Method. Enzymol.* 17: 955
43. Kang, K., M. Keeler, P.C. Dunlop, R.J. Roon (1982) *J. Bacteriol.* 151: 29-35.
44. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
45. Monod, J., J. Wyman y J.P. Changeux (1965) *J. Mpl. Biol.* 12: 88-118.
46. Fisher, S.H., Sorenstein, A.L. (1984) *J. of Bacteriol.* 157: 612-621.

47. Strassman, M. y S. Wemhouse (1963] J. Am Chem. Soc. 75: 1680.
48. Matsuda, M. y M. Ogur (1969] J. Biol. Chem. 244: 3352.
49. Zelikson, R. y M. Luzzatti (1976] Eur. J. Biochem. 64: 7
50. Ogur, M., T.N. Lie, I. Cheung, I. Paula victus, W. Wales, D. Mehnert y D. Blaise. (1977] J. Bacteriol. 129: 926-933.
51. Ulane, R., y M. Ogur (1972] J. Bacteriol. 109: 34-43.
52. Thayer, P.S. y N.H. Horowitz. (1951] J. Biol.Chem. 192: 755-767.
53. Sikora L, y G.A. Marzluf (1984] Mol.Gen. Genet 183: 33-39.
54. Messenguy, F.,D. Colln, y J. Ten Have (1980] Eur. J. Biochem. 108: 439.

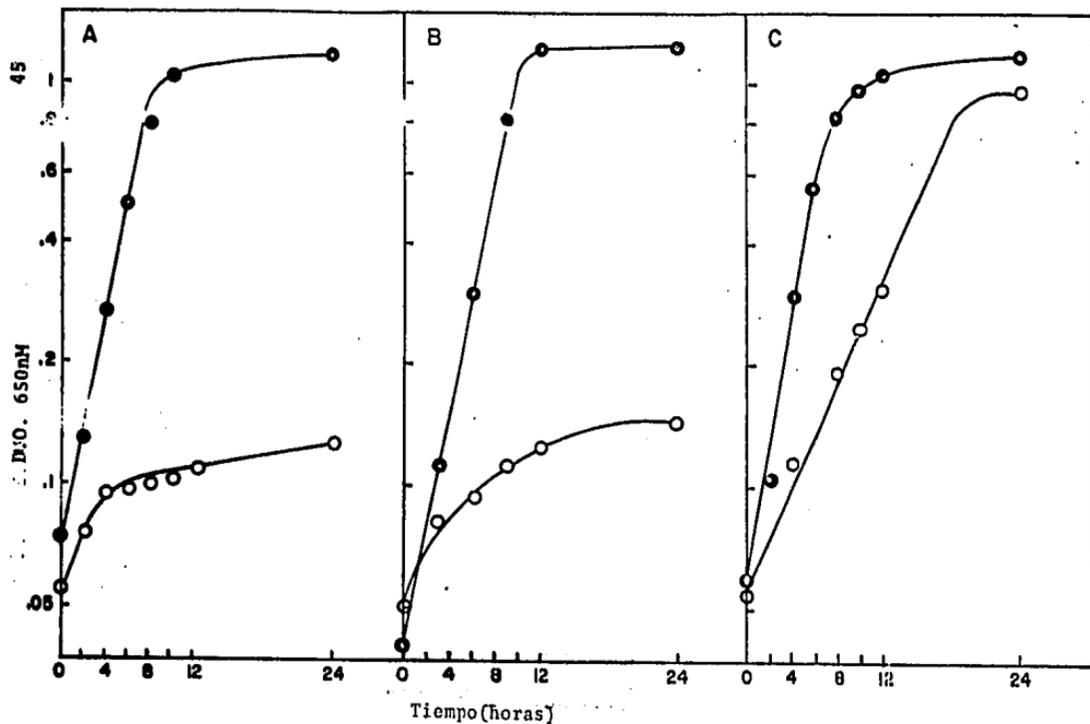


Figura 1. Crecimiento de las cepas S288C y CN10 en diferentes fuentes de nitrogeno. A: Glutamina, B: Glutamina + Amonio, C: Amonio. Simbolos: ● S288C, ○ CN10

TABLA 1. Pozas de Glutamina y Glutamato en las cepas S288C y CN10 en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno <sup>a</sup>	μmol/mg de proteína			
	Glutamina		Glutamato	
	S288C	CN10	S288C	CN10
Gln	N.D. <sup>b</sup>	0.88	0.06	0.90
Gln+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.18	0.95	0.27	0.77
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.07	0.32	0.45	0.29

<sup>a</sup>Gln, Glutamina.

<sup>b</sup>No detectable.

TABLA 2. Actividad de glutaminasa de las cepas S288C y CN10

Cepa	<i>in vitro</i> <sup>a</sup>	<i>in vivo</i> <sup>b</sup>
S288C	14.00	62.17
CN10	18.80	10.37

a La actividad de Glutaminasa se determinó a pH 8.5 y se expresa como nmolas de glutamato formado/min/mg proteína del ostracto celular.

b La actividad de glutaminasa se expresa como nmolas de glutamato formado/min./mg de proteína celular.

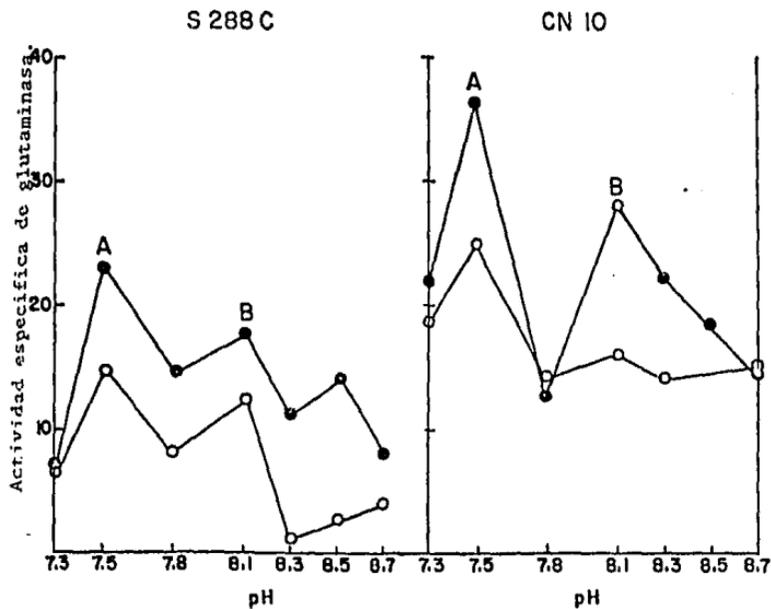


Figura 2. Actividad de glutaminasa a diferentes pHs.

Simbolos: ● Extractos dializados, ○ Extractos dializados calentados 15 min a 60°C.

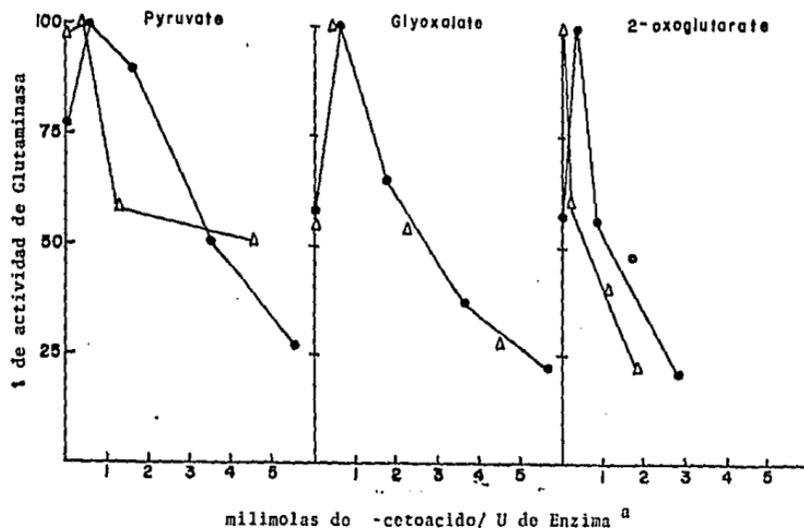


Figura 3. Inhibición de la actividad de Glutaminasa por  $\alpha$ -cetoácidos. La actividad de Glutaminasa se determinó a pH 8.5 con diferentes cantidades de cetoácidos.

<sup>a</sup> U de Enzima = 1 nmola de glutamato producido/min/mg de proteína  
 Símbolos: ● S288C, △ CN10

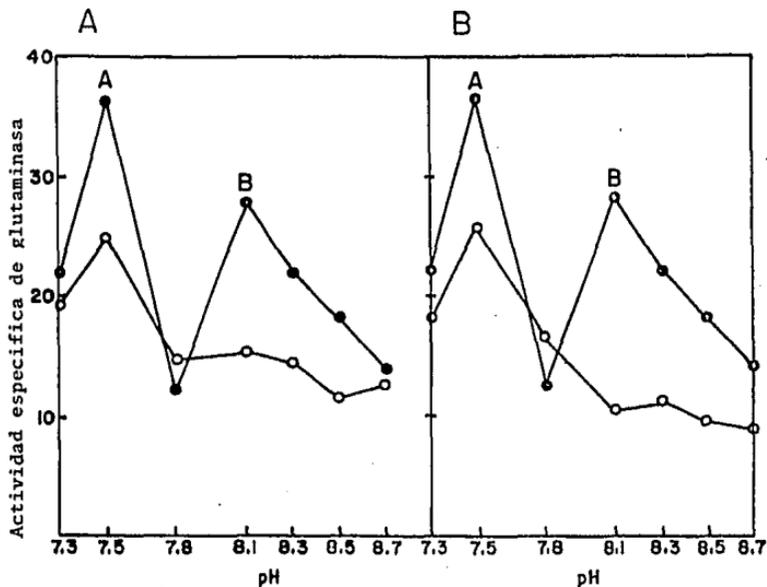


Figura 4. Actividad de Glutaminasa de la cepa CN10 a diferentes pHs.

A: Simbolos, ● actividad de extractos dializados; ○ actividad de extractos dializados + 100mmolar de piruvato.

B: Simbolos, ● actividad de extractos dializados; ○ actividad de extractos sin dializar.

Tabla 3. Actividad de Glutaminasa de las cepas S288C y CN10 en extractos celulares y en pelets tratados con detergente.

Fuente de Enzima	Actividad de Glutaminasa <sup>a</sup>			
	S288C	%de actividad	CN10	%de actividad
Actividad total	93.3	100	107.5	100.
Extracto celular	54	57.8	65.8	61
Pelet tratado con Triton <sup>b</sup>	39.2	42.1	41.7	39
Pelet tratado con Triton calentado <sup>c</sup>	41.2	44	47.3	44
Pelets sin Triton	21.1	22.6	27.7	25.7

a La actividad de Glutaminasa se determino a pH 7.5 y se expresa como nmolas de glutamato formado/min/ml de extracto celular.

b Los pelets se solubilizaron en el buffer de extracción con .1%de Triton X-100

c Los pelets solubilizados se calentaron 15 minutos a 60°C.

Tabla 4. Actividad de Transaminasa de glutamina de la cepa S288C  
en  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno

Condiciones de ensayo <sup>e</sup>	$\alpha$ -cetoglutarato <sup>a</sup>	fenilpiruvato <sup>b</sup>	fenilalanina <sup>c</sup>
Completo	5.3	5.3	5.6
- gln	N.D. <sup>d</sup>	.74	—
- fenilpiruvato	N.D.	—	—
- DON	2.11	—	—
+ Aminoxacético	N.D.	N.D.	—

a nmolas de  $\alpha$ -cetoglutarato formado/min/mg prot

b nmolas de fenilpiruvato desaparecido/min/mg prot

c nmolas de fenilalanina formado/min/mg prot

d No detectable

e fenilpiruvato 3mm, gln 10mm

Tabla 5. Actividad acoplada de la Transaminasa de glutamina y la  $\alpha$ -amidasa de la cepa S288C en  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno.

Condiciones de ensayo <sup>a</sup>	Actividad <sup>b</sup>
Completo	8.18
- cetoacido	2.94
- gln	1.22
Diferencia	4.02

a Fenilpiruvato 3mM, glutamina 10mM

b nmolas de  $\text{NH}_4^+$  formado/min/mg prot

Tabla 6. Actividad de Transaminasa de glutamina de la cepa S288C con diferentes  $\alpha$ -cetoácidos.

Cetoacido <sup>a</sup>	Actividad <sup>b</sup>
Glioxalato	11
Piruvato	3.2
Fenilpiruvato	3
$\alpha$ -cetosuccinamato	3.5
$\alpha$ -ceto adipato	1.4
$\alpha$ -cetoglutarato	N.D. <sup>c</sup>

a Todos los cetoácidos se ocuparon a una concentración de 5mM, excepto por el fenilpiruvato que se ocupó a 3mM; la gln se ocupó a 20mM

b La actividad se expresa como nmolas de  $\alpha$ -cetoglutaramato formado/min/mg prot.

Tabla 7. Actividad de Transaminasa de glutamina de la cepa S288C en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Actividad <sup>a</sup>	% de actividad
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + glutamato	10.81	100
Glutamato	10.39	96.1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + glutamina	8.7	80.65
Glutamina	8.24	76.2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5.1	47.17
YPD	2.02	18.6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + lisina	1.29	11.9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + glicina	1.69	15.7
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + alanina	4.5	42.2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + aspartato	7.9	73.5

<sup>a</sup> La actividad se expresa como nmolas de  $\alpha$ -cetoglutarato formado/min/mg prot  
Las condiciones de ensayo fueron, fenilpiruvato 3mM y gln 10mM.

Tabla 8. Cocentración intracelular de piruvato en las cepas S288C y CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno en diferentes condiciones aerobicas.

Condiciones aerobicas	nmolas/mg prot	
	S288C	CN10
1/6 v/a 175 rpm <sup>a</sup>	132.9	42
Sin agitar	293.6	143.4

a v/a v= volumen del medio, a=volumen del recipiente.

Tabla 9. Actividad de Glutaminasa de la cepa S288C en glutamina como fuente de nitrógeno en diferentes condiciones aerobicas.

Condiciones aerobicas	actividad de glutaminasa	
	<i>in vivo</i> <sup>a</sup>	<i>in vitro</i> <sup>b</sup>
1/6 v/a 175rpm	62.17	12.1
Sin agitar	N.D.	4.3
Mezcla de extractos	—	3.29 (8.25 <sup>c</sup> )

a La actividad se expresa como nmolas de glutamato formado/min/mg proteina celular

b La actividad se determino a pH 8.1 y se expresa como nmolas de glutamato formado/min/mg proteina del extracto celular.

c Valor esperado de la mezcla de extractos.

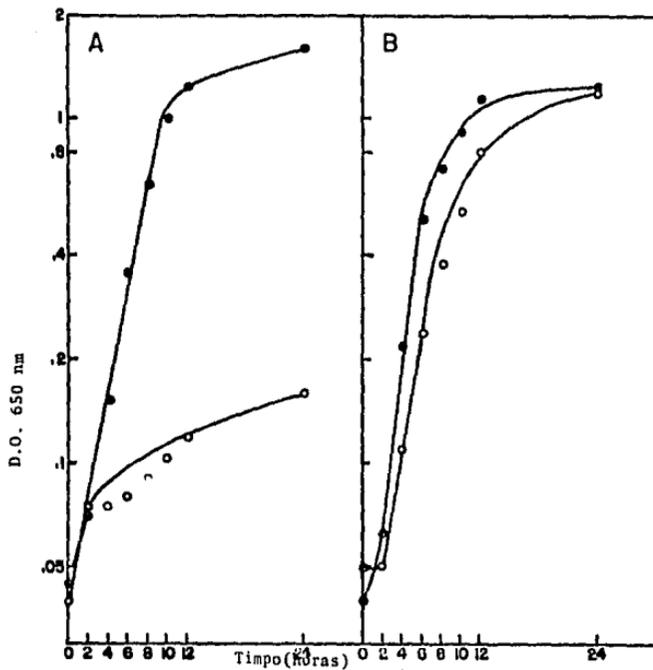


Figura 5. Crecimiento de las cepas S288C y CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno en diferentes condiciones aeróbicas. A: 1/6 v/a, v= volumen del medio, a= volumen del frasco. B: Sin agitar.  
 Símbolos: ● S288C ○ CN10

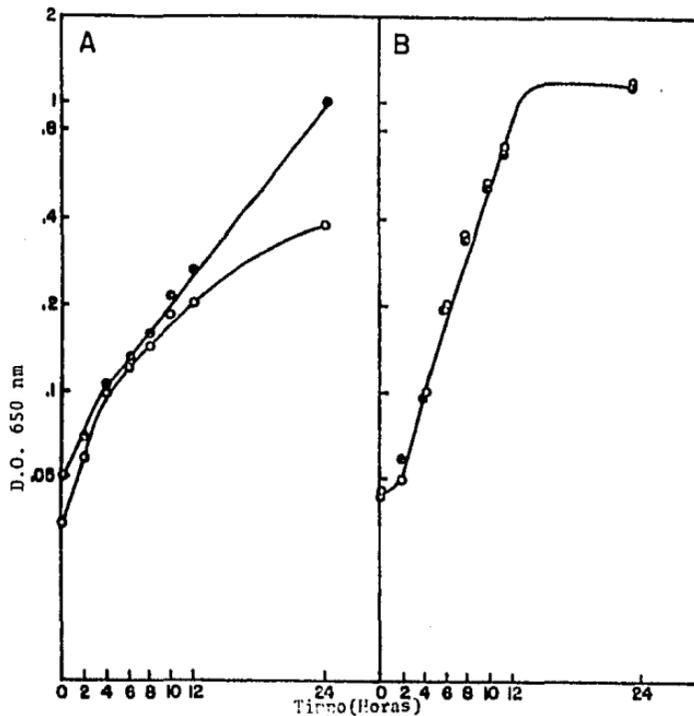


Figura 6. Crecimiento de la cepa CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno en diferentes condiciones aeróbicas. A: 1/2 v/a. B: sin agitar. v= volumen del medio, a= volumen del frasco. Símbolos: ● gln fuente de nitrógeno, ○ gln+lisina.

Tabla 10. Actividad de Transaminasa de glutamina de las cepas S288C y CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno en diferentes condiciones aerobias.

Condiciones aerobias	S288C			CN10		
	gln	gln+lisina	%de inhibición	gln	gln+lisina	%de inhibición
1/6 v/a <sup>a</sup> 175 rpm	6.07	N.D. <sup>b</sup>	N.D.	4.1	N.D.	N.D.
1/2 v/a 175rpm	8.24	1.3	84	6.3	1.0	84
Sin agitar	8.37	4.6	45	8.4	7.6	9.5

a v/a v= volumen del medio, a= volumen del frasco.

b No determinado

Tabla 11. Actividad de Transaminasa de glutamina y  $\omega$ -amidasa en  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrogeno.

Cepas	Transaminasa de glutamina <sup>a</sup>		Actividad acoplada trans gln $\omega$ -amidasa <sup>b</sup>
	+DON	-DON	
rM233	8.37	6.8	7.05
gln1	9.1	6.3	4.31
gln2	7.7	17.4	N.D.
gln3	7.4	11.38	1.8
gln4	9.1	9.4	N.D.
gln5	4	4.6	N.D.

a La actividad se expresa como nmolas de  $\alpha$ -cetoglutaramato/min/mg prot

b La actividad se expresa como nmolas de  $\text{NH}_4^+$  formado/min/mg prot

Las condiciones de ensayo fueron glioxalato 5mM, gln 10mM

Tabla 12. Pozas intracelulares de diferentes metabolitos de las cepas S288C y CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno

Metabolito	S288C <sup>a</sup>	CN10	S288C <sup>b</sup>
Glucosa <sup>c</sup>	0.741	12.98	0.03
Piruvato <sup>d</sup>	132.9	42	100
$\alpha$ -cetoglutarat <sup>d</sup>	15.97	3.97	76.19

a Cultivada en gln como fuente de nitrógeno

b Cultivada sin fuente de nitrógeno

c Concentración expresada como mg/mg de proteína del cultivo

d Concentración expresada como nmolas/mg de proteína del extracto.

Tabla 13. Actividad de Piruvato Kinasa de las cepas S288C y CN10 en glutamina como fuente de nitrógeno.

Cepas	Actividad <sup>a</sup>
S288C	4.45
CN10	1.8

a La actividad se expresa como  $\mu$ molas de piruvato formado/min/mg prot.

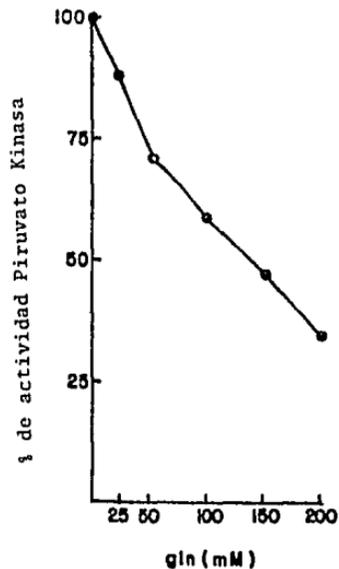


Figura 7. Actividad de Piruvato Kinasa de la cepa S288C con diferentes cantidades de glutamina en el ensayo.

100% de actividad =  $4.5 \mu\text{mol}$  de piruvato formado/min/mg prot

Fig. 8 Asimilación de Glutamina en S. cerevisiae