

**LA L-GLUTAMAT DESHIDROGENASA DE LLEVAT
(SOCA NORMAL I «PETITE MUTANT») ***

Comunicació presentada el dia 18 de desembre de 1969 pel doctor

FREDERIC MAYOR i ZARAGOZA

Professor del Departament de Bioquímica de la Universitat de Granada

* Treball efectuat amb la col·laboració de M. Ugarte, A. Cano i I. Núñez de C. al Departament de Bioquímica de la Universitat de Granada.

INTRODUCCIÓ

La L-glutamat deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3.) catalitza l'oxidació reversible de l'àcid glutàmic a 2-oxoglutarat i ió amoni. El paper d'ambdós substrats posa en relleu la importància d'aquest sistema enzimàtic en diverses vies metabòliques, encreuament del metabolisme glucídic i proteic i clau per a la incorporació de nitrogen inorgànic.

La glutamat deshidrogenasa (GDH) pot actuar amb els coenzims NAD i NADP (5,8) en molts éssers vius. L'especificitat del coenzim depèn de la font. L'enzim de plantes sembla actuar solament amb NAD, i el que prové de fetge d'animals superiors empra NAD i NADP. Inicialment hom cregué que l'enzim de llevat treballaria solament amb NADP.

Després d'alguns anys de treball hom ha arribat a la conclusió que la GDH de llevat pot actuar amb NAD i NADP; es tracta, doncs, de dos sistemes enzimàtics, amb diferents característiques cinètiques i probablement amb diferent localització cel·lular. L'ús d'un coenzim o altre, el sentit de la reacció i la repressió o inducció de l'activitat enzimàtica depenen de les condicions metabòliques i, consegüentment, de la disponibilitat de nucleòtids. Tot això posa de manifest el paper regulador d'aquest enzim ⁷.

Hem estudiat l'activitat GDH del llevat de forneria cultivat en diferents fonts de carboni i a diferents concentracions.

El llevat ha estat cultivat en aerobiosi i en anaerobiosi. També hom ha estudiat, a la «petite mutant», la repressió de la reacció aminant per altes concentracions d'amoni, la qual cosa planteja la possible existència, en aqueixes condicions, d'una altra via d'aminació. La comparació entre les activitats GDH-NAD i GDH-NADP de cèl·lules normals i mutants i l'efecte Crabtree produït per la creixent concentració de sucres poden contribuir a aclarir aquesta cruïlla metabòlica ⁴.

MATERIAL I MÈTODES

Hom cultiva les cèl·lules a 30° C. Els cultius en anaerobiosi són duts a terme en un flux d'oxigen, i hom cull les cèl·lules al cap de 24 hores.

Els cultius en anaerobiosi a la Campana de Mackintosh, en cambra termostatzada, i la mutant creix per simple aireació produïda per agitació mecànica; en ambdós casos hom cull les cèl·lules al cap de 48 hores. Hom mesura l'activitat enzimàtica a 340 nm en un espectrofotòmetre Beckman DB amb registrador automàtic. Hom controla la temperatura de reacció a les cubetes a 30° C. Hom determina la concentració proteica pel mètode de Lowry¹⁰. Les cèl·lules creixen en el medi de Lindegren⁹ modificat per l'addició d'amoni, aminoàcids o sucres (glucosa i galactosa 0.1 a 10 g per 100 ml de medi).

RESULTATS

Hom mostra a la taula I els nivells d'activitat enzimàtica de la «petite mutant» i de cèl·lules normals crescudes en aerobiosi i en anaerobiosi en medis enriquits amb sucres (0,3 i 10 g %). Hom pot observar que quan les cèl·lules creixen en un medi que conté 0,3 % de sucres (glucosa o galactosa), l'activitat significativa de la reacció aminant correspon a la GDH-NADH.

D'altra banda, quan les cèl·lules normals creixen en anaerobiosi (glucosa o galactosa) l'activitat GDH-NADH disminueix, mentre que la GDH-NADPH predomina. En la «petite mutant» les activitats són de sentit similar a les de cèl·lula normal crescuda en anaerobiosi. Quan hom alimenta les cèl·lules amb una alta concentració de sucres, els valors alts d'activitat corresponen en tots els casos, a la GDH-NADPH. Per a les cèl·lules crescudes en aerobiosi, la incorporació d'amoni és major quan les cèl·lules creixen en galactosa que quan creixen en glucosa¹⁴.

A concentracions molt baixes de sucres (0,1 %), l'activitat GDH-NADH és menor que la GDH-NADPH. Hom pot explicar aquests resultats per una repressió inicial per sucres dels enzims respiratoris i que en esgotar-se la font carbonada i disminuir el creixement no es produeix derepressió de l'efecte inicial¹¹ i es troben les activitats resultants a les cèl·lules collides al cap de 24 hores. Efectivament, després de 2-4 hores d'incubació, la glucosa del medi ha estat consumida i en aquestes condicions la cèl·lula no posseeix capacitat oxidativa i el creixement s'atura. A una concentració del 0,3 % hom ha observat que l'activitat GDH-NADPH decreix i que hi ha un augment de l'activitat que col·labora amb NADH. A l'1 % l'activitat d'ambdós enzims és pràcticament igual.

L'efecte de la font nitrogenada sobre l'activitat GDH-NADPH ha estat també estudiat. Sempre l'amoni actua com un repressor de l'activitat de la glutamat deshidrogenasa. A les cèl·lules normals els nostres resultats estan d'acord amb els obtinguts per Holzer¹. A la taula II hom mostra els

efectes de la font nitrogenada sobre l'activitat GDH-NADPH en «petite mutant». L'activitat major correspon als cultius amb glutamat i alanina com a font de nitrogen. En tots els casos la presència d'amoni (sol o amb una altra font nitrogenada) reprimeix l'activitat.

TAULA I

	Glucosa 0,3 %		Galactosa 0,3 %		Glucosa 10 %		Galactosa 10 %	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Cèl·lules crescudes en aerobiosi	210	27	248	41	49	168	16	430
Cèl·lules crescudes en anaerobiosi	13	37	14	34	36	112	18	248
Cèl·lules deficientes respiratòries («petite mutant»)	30	92	66	90	27	207	21	175

Efecte de la font de carboni i concentració de sucres sobre l'activitat GDH-NADH i GDH-NADPH. Activitat expressada en $m\mu\text{mols/mg proteïna/min.}$

TAULA II

Font de Nitrogen		GDH-NADPH	GDH-NADH
NH ₄ ⁺ (*)	0.15 g/100 ml de medi	74	13
NH ₄ ⁺	2.0 g/100 ml de medi	15	2
Peptona	” ”	52	6
Peptona + NH ₄ ⁺ (1:1)	” ”	18	4
Glutamat	” ”	135	8
Glutamat + NH ₄ ⁺ (1:1)	” ”	49	7
Alanina	” ”	135	5
Alanina + NH ₄ ⁺ (1:1)	” ”	55	5
Glicocola	” ”	78	4
Glicocola + NH ₄ ⁺ (1:1)	” ”	43	6
4-Aminobutíric	” ”	35	2
4-Aminobutíric + NH ₄ ⁺ (1:1)	” ”	14	1

Efecte de la font nitrogenada sobre l'activitat GDH-NADPH i GDH-NADH a «petite mutant». Activitat expressada en $m\mu\text{mols/mg proteïna/min.}$

(*) Com $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

DISCUSSIÓ

Probablement l'activitat depèn de la disponibilitat cel·lular de nucleòtids (raó NADH/NAD^+ i NADPH/NADP). En el cicle tricarboxílic les reaccions que col·laboren amb NADP tenen lloc entre el piruvat i el 2-oxoglutarat, mentre que per a les reaccions que van de succinat a citrat cal solament NAD . Això, unit a la funció limitant de la 2-oxoglutarat deshidrogenasa, suggereix que el treball del cicle tricarboxílic tindrà una influència directa sobre l'activitat de la glutamat deshidrogenasa.

Com hem vist, hom troba diferències significatives a la reacció aminant entre GDH-NADH i GDH-NADPH . Quan l'administració de NADPH està assegurada pel cicle de les pentoses-fosfat (elevat en hipòxia) i per la isocitrat deshidrogenasa del citoplasma, llavors la GDH/NADPH actuarà preeminentment en sentit aminant. Hom coneix molt bé que en molts microorganismes la biosíntesi de diversos enzims és reprimida per l'addició de glucosa al medi de cultiu¹³. La repressió per altes concentracions de glucosa de certs enzims del cicle tricarboxílic i de la cadena respiratòria es comprèn bé, perquè és més senzill per a la cèl·lula d'obtenir energia per fermentació¹², el pas a etanol essent la millor via per a recuperar el NAD . Quan la relació NADH/NAD augmenta, la concentració de 2-oxoglutarat disminueix i la producció de NADH deguda al cicle tricarboxílic s'atura³. L'activitat amb els dos nucleòtids segueix un camí invers a mesura que augmenta la concentració de sucres en el medi. L'activitat NADPH augmenta quan els aportaments nutritius afavoreixen les reaccions que col·laboren amb NADP .

D'altra banda, l'activitat GDH disminueix a mesura que augmenta el gradient d'amoni. Segons Holzer, l'amoni sembla actuar com un repressor de la síntesi «de novo» de l'enzim^{7,2}, però en estudiar la reacció en sentit desaminant en extrems de «petite mutant», no hem trobat correspondència amb la inhibició observada en sentit invers. És probable que tant els sucres com l'amoni actuïn sobre l'activitat, sense afectar la biosíntesi de l'enzim, en la regulació de la qual incidirien efectors unidireccionals. La baixa activitat trobada a la «petite mutant» quan la concentració d'amoni és alta —essent notable el creixement cel·lular— suggereix l'existència d'una altra via d'aminació cel·lular simultània a la de glutamat deshidrogenasa.

BIBLIOGRAFIA

1. BERNHARDT, W.; PANTEN, K., i HOLZER, H. — «Biochem. Biophys. Acta», 99, p. 531 (1965).
2. BERNHARDT, W.; ZINK, M., i HOLZER, H. — «Biochem. Biophys. Acta», 118, p. 549 (1966).
3. CHAPMAN, C., i BARTLEY, W. — «Biochem. J.», 107, p. 455 (1968).
4. FOURCADE, A. — «Bull. Soc. Chim. Biol.», 50, p. 1671 (1968).
5. FRIEDEN, C. — «J. Biol. Chem.», 240, p. 2028 (1965).
6. GAUTHERON, D.; DURAND, R.; YOUNES, A., i HONG CHOUG HO. — «Bull. Soc. Chim. Biol.», 50, p. 2121 (1968).
7. HOLZER, H. — «Biochem. J.», 98, p. 37 (1966).
8. LÉJOHN, H. B. — «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 28, p. 96 (1967).
9. LINDEGREN, C. C.; NAGAI, S., i NAGAI, H. — «Nature», 182, p. 446 (1958).
10. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., i RANDALL, R. J. — «J. Biol. Chem.», 193, p. 265 (1951).
11. MILLS, A. K. — *Aspects of Yeast Metabolism*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, p. 197 (1967).
12. MILLS, A. K. — *Aspects of Yeast Metabolism*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, p. 171 (1967).
13. POLAKIS, E. S.; BARTLEY, W., i MEEK, G. A. — «Biochem. J.», 90, p. 369 (1964).
14. POLAKIS, E. S., i BARTLEY, W. — «Biochem. J.», 97, p. 284 (1965).

DISCUSSIÓ

DR. ORIOL i BOSC

Fa uns quants anys hom intentava d'explicar l'acció hormonal mitjançant un possible efecte de les hormones sobre l'activitat dels enzims. Yel-ding i Tomkins (*Recent Progress in hormone Research* 1962) demostraren un efecte dels estrògens sobre la Glutàmic Deshidrogenasa de fetge boví. Es pregunta si aquest efecte es manifesta també amb l'enzim de llevat que utilitza el Prof. Mayor, pregunta que pot tenir interès en relació amb l'evolució molecular, tot i que no creu que aquests organismes tinguin necessitat, ni puguin produir, hormones estrogèniques.

DR. MAYOR

Disposa aquí d'un extens treball fet per la Dra. Ugarte, en el qual hom recull la bibliografia dels efectors que, fins al moment present, semblen actuar sobre la reacció a través d'un procés de despolimerització-polimerització (l'efecte del GDP i GTP és especialment interessant).

Concretament, les hormones estrogèniques —i aquelles substàncies, com el dietil-estilbestrol, que té una configuració espacial semblant i una similar activitat— produeixen «in vitro» la despolimerització de la glutamat deshidrogenasa obtinguda de diversos orígens en els quals es troba, aparentment, en grau elevat d'agregació (C. M. Tonkins i col·lab. «Proc. Natl. Acad. Sci.» 47, 270, 1961; Yielding i col·lab., «Biochem. Biophys. Research Com.» 2, 203, 1960). També ha estat comunicat el clar efecte que produeixen la tiroxina i la triiodo-tironina (J. Wolff. «J. Biol. Chem.», 237, 236, 1962). Això no obstant, Frieden (C. Frieden, «Biochem., Biophys. Research Com.» 10, 410, 1963) ha interpretat de manera molt diferent els resultats pertanyents a la influència de les substàncies esmentades.

Un aspecte molt suggestiu de la pregunta formulada pel Dr. Oriol és el referent a la distinta complexitat de polimerització des del punt de vista evolutiu. Efectivament, els treballs fets amb glutamat deshidrogenasa de tauró (L. Corman i col·lab. «J. Biol. Chem.» 242/7, 1383, 1967) i de cap-gros (T. A. Wiggert i C. P. Cohen, «J. Biol. Chem.», 241, 210, 1966) indiquen que es tracta d'un monòmer, mentre que la procedent d'altres orígens (fetge d'animals superiors) mostra un grau de polimerització molt més alt (16 unitats o més). Sembla que hi ha, per tant, una notable correlació entre la polimerització i el nivell evolutiu. Es tracta de sistemes isoenzimàtics, perquè la funció que produeixen és la mateixa, però amb diferent grau d'agregació molecular.

Referent a això, nosaltres hem limitat el nostre interès a l'estudi de l'efecte del GTP, que s'origina en la reacció «pròxima» de la 2-oxoglutarat deshidrogenasa. Els experiments amb nucleòtids comprenen aspectes generals del metabolisme, menys concrets —però no menys importants— que els de les hormones, l'estudi de les quals cal centrar, lògicament, en els sistemes enzimàtics procedents d'éssers superiors.