

NUCLEÓTIDOS LIBRES EN LA LEVADURA Y ADAPTACION A LA UTILIZACIÓN DE GALACTOSA

NORBERTO J. PALLERONI¹

SUMMARY. In previous experiments performed in this laboratory, we have observed that cells grown for 5 hours in autolyzed yeast with 2 per cent glucose, utilize galactose after an adaptation period which is considerably longer than the one for cells grown for 24 hours in the same medium. This phenomenon can be correlated with the composition of the nucleotide pool of the respective cells. Thus, 5 hours-old cells have much less quantities of uridine compounds, particularly of UDPG. The delay in adapting to galactose utilization could thus be attributed to this deficiency in young cells, although it is also possible that the uridine compounds are converted to peptidyl-nucleotides which could function as repressors in the induced synthesis of the enzymes involved in galactose metabolism.

INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio fue observado el hecho de que cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* muestran una capacidad muy disminuida de adaptación a la utilización de galactosa en las primeras horas de cultivo en un medio constituido por agua de levaduras autolizadas, con dos por ciento de glucosa (1). Células cultivadas por 12 a 24 horas en ese medio a 30 C, se adaptan luego de una hora y media a dos horas a partir del contacto con galactosa. Si se toman, en cambio, células más jóvenes (cultivadas por tres y media a cinco horas en el mismo medio), la utilización de galactosa se observa luego de un periodo considerablemente mayor.

Si el medio de cultivo se diluye, o si se lo cambia por medios de riqueza nitrogenada total más baja, manteniendo la concentración de glucosa al mismo nivel, el fenómeno del alargamiento del período de adaptación ya no se observa, vale decir, las células se adaptan en el tiempo normal. Tampoco se observa disminución en la adapta-

¹ Profesor Titular con dedicación exclusiva en la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.C.

bilidad si las células son cultivadas en superficie en el medio rico solidificado con agar o gelatina.

Estas y otras observaciones señalan que la capacidad de adaptación no se altera en células que han sido mantenidas a un ritmo de multiplicación apropiado. Numerosas experiencias de crecimiento y manométricas sugieren que en las células jóvenes cultivadas en un medio de cultivo rico, ocurre un empobrecimiento en algunas sustancias esenciales para la síntesis o para el funcionamiento del sistema enzimático que cataliza la conversión de galactosa en derivados de glucosa.

El fenómeno no es debido a diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa de los aminoácidos libres del citoplasma ("amino acid pool"), por cuanto los cromatogramas de extractos de células de 5 y 24 horas no mostraron diferencias apreciables. Es bien conocido el hecho de que las levaduras contienen también un "pool" de nucleótidos (2), y en estos últimos tiempos han sido caracterizados diversos peptidil-nucleótidos en extractos obtenidos con ácido tricloroacético (3, 4). Dado que los nucleótidos libres pueden intervenir en diversos procesos metabólicos funcionando como coenzimas, hemos creído conveniente intentar el estudio de la composición nucleotídica de las células jóvenes, en las cuales la capacidad de adaptación a la utilización de galactosa se halla disminuida, en comparación con células más viejas, con períodos normales de adaptación. Desde ese punto de vista, era importante circunscribir nuestra atención, especialmente en los primeros estudios, a los compuestos de uridina y, en particular, a uridina difosfato glucosa, coenzima que interviene en el proceso de conversión de galactosa en glucosa.

El objeto del presente trabajo ha sido tratar de establecer alguna relación entre la presencia de uridina difosfato glucosa libre en el citoplasma y la capacidad de adaptación a la utilización de galactosa.

MATERIAL Y METODOS

En todas las experiencias se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* que ha sido aislada de mostos de uva en fermentación y que figura en nuestra colección con la denominación 20SJ. Las células fueron cultivadas por 5 625 horas en agua de levaduras autolizadas preparada de acuerdo a ORLA-JENSEN (5), con dos por ciento de glucosa. El cultivo se hizo en agitador rotatorio a una temperatura de 30°C, y al cabo de los tiempos señalados, las células fueron cosechadas con centrifuga continua Sharples, y lavadas dos veces con agua. Una muestra fue estudiada en el aparato de Warburg, suspendiendo las células en buffer de fosfato M/30 a pH 4,2 (3 mg de sustancia seca en 2 ml. por frasco) y agregando 40 micromoles de

galactosa. El resto de la masa celular fue conservado a 20C bajo cero hasta su uso. En el momento del análisis, la masa fue descongelada y suspendida en un volumen igual de agua. El recipiente con la suspensión fue sumergido en un baño de agua hirviente (unos 96° C) por cinco minutos, revolviendo constantemente con varilla. La suspensión fue rápidamente enfriada en baño de hielo, y centrifugada a 14.000 x g durante 30 minutos a 0 C. El volumen de sobrenadante obtenido luego de esta centrifugación fue de 135 a 140 por ciento el volumen de agua utilizada para suspender las células antes del calentamiento. Cinco milímetros de ese sobrenadante fueron estudiados por vez.

La cromatografía de intercambio aniónico fue realizada de acuerdo a HURLBERT y colaboradores (6), utilizando resina Dowex 1 x 10, 200 - 400 mesh en la forma formiato. El colector de fracciones (Research Specialties O, Modelo E-1) fue adaptado a la colección de dos columnas simultáneamente. Utilizó dos columnas de resina de 1 cm de diámetro y 20 cm de altura, alimentándolas con un solo conjunto de mezclador y reservorio de solución concentrada. Se utilizó mezclador de 565 ml. y puso en el reservorio sucesivamente 860 ml. de fórmico 4 M, 860 ml. de fórmico 4 M -formiato de amonio 0,2 M, y finalmente, solución de fórmico 4 M -formiato de amonio 0,4 M hasta aparición del pico combinado de GTP y UTP (unos 180 ml. del último eluyente, o sea, 1040 ml. en total para cada columna). Se recogió 3,1 ml. por tubo, aproximadamente, a un caudal no mayor de 0,7 ml. por minuto, y las fracciones fueron observadas en el espectrofotómetro Uvispek de Hilger a 260 milimicrones, con cubetas de cuarzo de 1 cm. de espesor. Las fracciones centrales de cada compuesto fueron estudiadas también a 275 milimicrones. En todos los casos usó agua para llevar a cero, y en los cromatogramas se nota, por consiguiente, el aumento paulatino de la densidad óptica de fondo, correspondiente al aumento en la proporción de fórmico en la elución. Tal como lo indican HURLBERT y colaboradores (6), la lectura a 275 milimicrones ayuda en la identificación de las bases de los nucleótidos, utilizando las siguientes relaciones $E_{260} : E_{275}$ aproximadas: 0,4 adenosina; 0,6: uridina; 0,75: guanosina; 1 a 2: citidina.

Las fracciones de interés fueron evaporadas al vacío, y en caso de tener formiato de amonio, éste fue eliminado por sublimación o por rápido pasaje a través de Dowex 50 (H+) a baja temperatura y evaporación al vacío. Este último procedimiento dio buenos resul

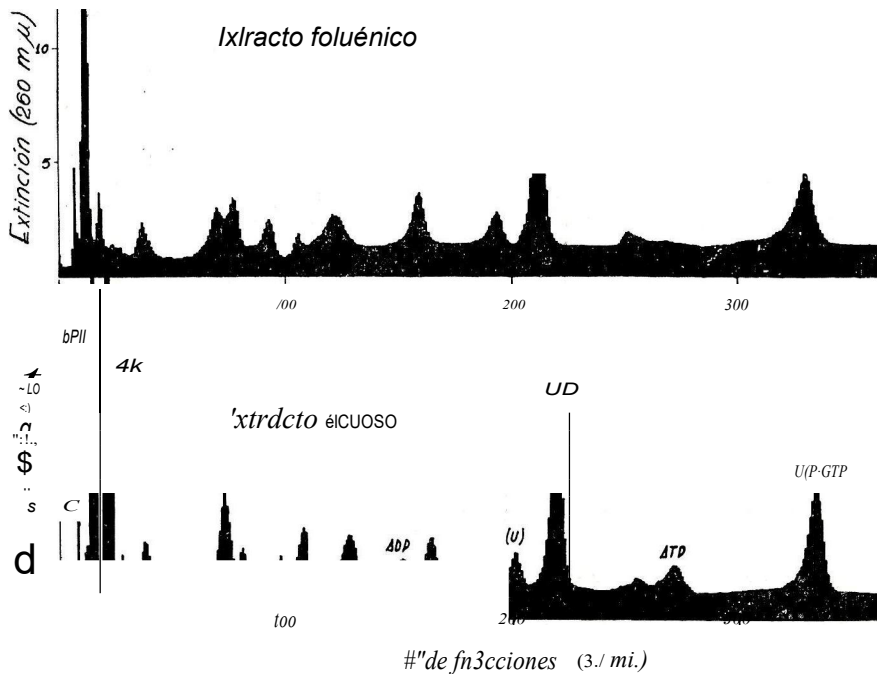
* Las abreviaturas utilizadas en el texto y en los gráficos significan:

AMP: adenosina monofosfato; ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; CMP: citidina monofosfato; DPN: difosfopiridina nucleótido; CTP: guanosina trifosfato; UDPG: uridina difosfato glucosa; UTP: uridina trifosfato; (U) : compuesto de uridina no identificado.

tados aún con compuestos muy lábiles. La identificación de los componentes de interés fue realizada por cromatografía de papel del nucleótido y de algunos de sus productos de hidrólisis parcial, por la determinación de fósforo total luego de la purificación por cromatografía, y, en el caso de **DPN**, por el cambio de espectro en el ultravioleta luego del agregado de cianuro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos preparados de acuerdo a la técnica de extracción acuosa fueron comparados con extractos obtenidos mediante el uso de tolueno, siguiendo los pasos iniciales del método de PoNTIS y colaboradores (7). La levadura fue mezclada con un volumen igual a 0,1 de su peso en tolueno a 36 9C, y la mezcla fue mantenida a esa temperatura durante 40 minutos con agitación frecuente. Luego agregó un volumen de alcohol igual al peso de la levadura, y puso en bañomaría hirviente hasta que la mezcla entró en ebullición. Al día



siguiente centrifugó a $1.650 \times g$ durante una hora en frío. El sobrenadante fue concentrado al vacío a baja temperatura, y llevado al volumen original con agua. La turbidez del extracto no pudo ser eliminada por centrifugación, ya que el material insoluble ilota y se mantiene subdividido. Se prefirió dejar el extracto tal cual, y se aplicó directamente a la columna o se mantuvo congelado a $20^{\circ}C$ hasta su uso.

El primer par de cromatogramas (figura 1) corresponde a un extracto acuoso y a otro toluénico de dos muestras idénticas de células. Puede observarse que las cantidades de UDPG extraídas por ambos métodos son similares. El extracto toluénico tiene importantes ventajas sobre el acuoso cuando se lo utiliza para la preparación de UDPG, ya que es menor la cantidad de sustancias contaminantes que contiene. Así, la densidad óptica total a 260 milimicrones del extracto acuoso es cerca del doble de la del extracto toluénico. En los cromatogramas puede observarse que el extracto acuoso es considerablemente más rico en el pico que contiene AMP, y también se observan diferencias en otros picos que no hemos identificado. No obstante estas ventajas del extracto toluénico en relación al estudio de UDPG y otros compuestos de uridina, la sencillez de la preparación del extracto acuoso en pequeña escala ha sido el factor para la adopción de este procedimiento en todos los análisis efectuados.

La figura 2 muestra un par de cromatogramas obtenidos con células de 5 y de 24 horas. Las experiencias manométricas de control mostraron adaptación normal en las células de 24 horas y ausencia de adaptación en las de 5 horas de edad, luego de 4 horas de agitación en el aparato de Warburg en las condiciones señaladas.

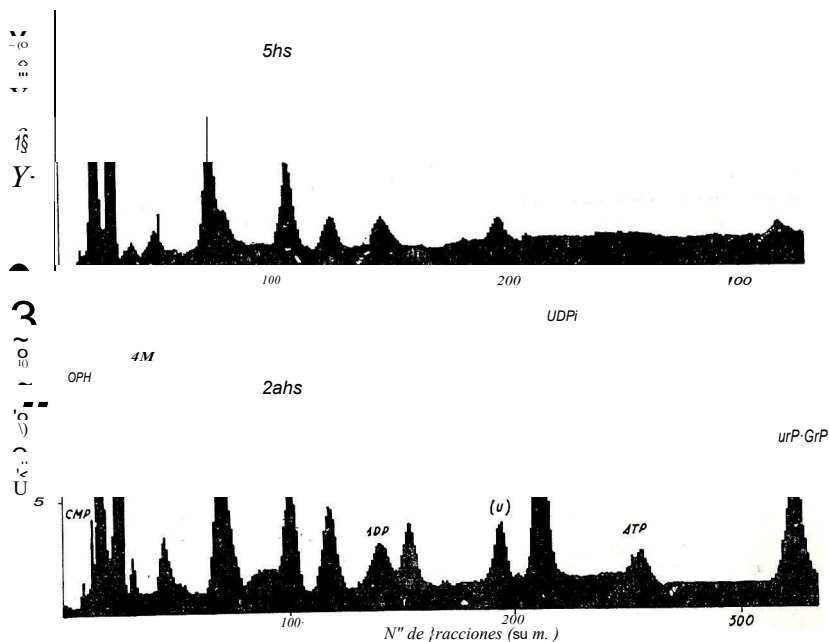
Los cromatogramas muestran diferencias de interés. El cromatograma que corresponde a las células de 24 horas posee varios picos que se hallan ausentes en las células más jóvenes. Llama particularmente la atención la ausencia de UDPG. También han desaparecido otros picos de uridina que no hemos caracterizado en forma completa, y hay una disminución considerable en la altura del pico combinado de GTP y UTP. Los resultados están de acuerdo con la observación de CAPUTTO y colaboradores (8) según la cual la cantidad de UDPG en las levaduras puede variar entre límites amplios. Estudios más detallados del "pool" de nucleótidos por HARRIS y colaboradores (9), realizados con células tomadas en distintos períodos del crecimiento de la población, muestran justamente el notable empobrecimiento en compuestos de uridina a las pocas horas del cultivo.

La deficiencia de UDPG puede ser la causante de la dificultad de las células para adaptarse a la utilización de galactosa, ya que aquel compuesto interviene en la reacción catalizada por la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (ver ecuación 3 más adelante). El bajo nivel de UTP (y también de ATP, que interviene en la síntesis

de éste) en las células de 5 horas puede ser también un factor de importancia, ya que ese nucleótido es precursor de UDPG en la reacción.

1) UTP \rightarrow glucosa-1-fosfato \gg UDPG + pirofosfato (10)

Nuestros intentos de suplementar a las células con distintas sustancias a fin de que pudieran recuperar el nivel apropiado de la coenzima, han fallado. El agregado de distintos amino ácidos, bases purínicas o pirimidínicas, o nucleósicos a las células durante las experiencias manométricas, no han permitido acelerar la adaptación, con la excepción de las experiencias en las cuales agregó asparagina, que mostraron mejor adaptabilidad. Ácido aspártico también fue hallado estimulante, aunque en menor grado. De cualquier modo, con el agregado de esas sustancias al principio de las experiencias manométricas, junto con el agregado de la galactosa, no se logra restituir la adaptabilidad normal. No obstante ser asparagina y ácido aspártico precursores de los compuestos de uridina, los resultados no son convincentes por tratarse de precursores relativamente aleja-

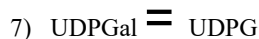
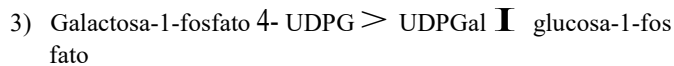
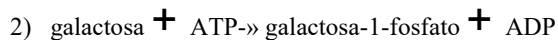


dos y que tienen, por otra parte, un buen número de otras funciones en el metabolismo.

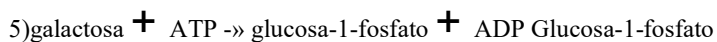
Resulta interesante mencionar que en nuestros experimentos el agregado del uracilo y de ácido orótico ha dado resultados negativos. En investigaciones realizadas sobre los aspectos dinámicos de la reserva de nucleótidos en la levadura, HARRIS y NEAL (11) encontraron que las células son capaces de incorporar adenina y uracilo con relativa facilidad. La incorporación de adenina en 30 horas alcanza al 75 por ciento de la radioactividad inicialmente presente en esa base, y la absorción de uracilo alcanza aproximadamente a 35 por ciento en el mismo lapso. No obstante, en las etapas iniciales, la absorción es similar para ambas bases. Además, el uracilo incorporado aparece rápidamente en la fracción extraíble con alcohol, en la cual se hallaría UDPG. Quedaría por ver si el uracilo incorporado pasa a compuestos como UDPG o sus precursores.

Parece probable que tal incorporación ocurra, y ello plantea una posibilidad de interés. Las modernas teorías acerca de la adaptación enzimática (12) postulan la existencia de sustancias que actúan como represores en la síntesis de las proteínas inducibles. El inductor (en el caso presente, la galactosa) actuaría oponiéndose a la acción del represor. Es posible que los compuestos que HARRIS y colaboradores encuentran en la fracción soluble en ácido tricloroacético (peptidilnucleótidos) puedan actuar como represores. La diferencia en el comportamiento de las células de 5 horas y las de 24 horas residiría en el nivel de represores a cuya acción debe oponerse el inductor. Esta hipótesis resulta tal vez más razonable que la de la carencia de UDPG libre. Cantidades muy pequeñas de este nucleótido tal vez bastarían para permitir a las células en reposo metabolizar la galactosa, produciendo la energía necesaria para sintetizar mayor cantidad de UDPG a través de UTP, y para la síntesis de las proteínas del sistema galactozimásico.

La adaptación a la utilización de galactosa es un proceso complejo. El camino que lleva desde galactosa hasta un intermediario del metabolismo de la glucosa se representa en las ecuaciones:



La suma de las tres ecuaciones da :



Glucosa-1-fosfato puede ser convertido en glucosa-6-fosfato por acción de las fosfoglucomutasa.

La síntesis de la cantidad catalítica de UDPG necesaria para la conversión ocurre según la ecuación 1. Trabajando con mutantes de levaduras, ROBICHON SZULMAJSTER (13) llegó a la conclusión de que las enzimas que catalizan las reacciones 2, 3 y 4 no obedecen al principio de la adaptación secuencial observada por STANIER en *Pseudomonas* (14). UDPGal-4-epimerasa, enzima que cataliza la reacción 4, no se halla presente hasta tanto no haya galactosa en el medio. El mutante incapaz de sintetizar galactosa-1-fosfato por carecer del gen dominante que rige la síntesis de la kinasa respectiva puede, no obstante, sintetizar galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (enzima que cataliza la reacción 3) y UDPGal-4-epimerasa. En otras palabras, la ausencia de galactosa-1-fosfato que, según la teoría de STANIER, debiera desencadenar la inducción secuencial, no parece ser indispensable para la aparición de las enzimas de la transformación de galactosa-1-fosfato en glucosa-1-fosfato. ROBICHON-SZULMAJSTER concluye que la galactosa induce la síntesis de las enzimas mencionadas sin ser sustrato de las mismas, de manera análoga a la acción de la galactosa en la inducción de beta-galactosidasa (15) y de betagalactósido permeasa (16).

Las células de 5 horas de edad muestran un período de inducción considerablemente más largo que el de las células de 12 6 24 horas. No obstante, según hemos observado, a poco de estar en contacto con galactosa tienen galactokinasa, la enzima que cataliza la síntesis de galactosa-1-fosfato (reacción 1). Esto prueba que las células son permeables a la galactosa, por lo menos en cuanto se refiere al acceso del azúcar a la región que interviene en la inducción de la kinasa. Si la galactosa tiene libre acceso a las regiones en las que interviene como inductor, es evidente que las células jóvenes aparecen como un material excelente para el estudio de la influencia de UDPG en la síntesis inducida de la transferasa, ya que representa el caso complementario del mutante estudiado por ROBICHON-SZULMAJSTER, al disponer de una fuente de galactosa-1-fosfato y carecer en cambio de UDPG.

RESUMEN

En experimentos realizados anteriormente en este laboratorio, se pudo observar un retardo considerable en la adaptación a la utilización de galactosa en las células de 5 horas de edad, en relación a las células cultivadas por 24 horas en el mismo medio (agua de levaduras autolizadas con dos por ciento de glucosa). Este fenómeno guarda relación con la composición de los nucleótidos libres de las células respectivas, ya que las células de 5 horas tienen cantidades sensiblemente menores de compuestos de uridina, particularmente de UDPG. La dificultad de adaptación de las células jóvenes podría

ser atribuida a esa deficiencia, aunque también es posible que los compuestos de uridina pasen a formar parte de peptidil-nucleótidos que funcionarían como represores en la síntesis inducida de las enzimas del sistema galactozimásico.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) GÓMEZ, R. A., SoLANES, R. E., DE PRITZ, M. J. R. y PALLERONI, N. J., *Holmbergia* 6, 11, 1959.
- 2) SPIELGELMAN, S. HALVORSON, H. O., y BEN-ISHAI, R., '*Amino Acid Metabolism*', editado por W. D. McElroy y B. Glass, p. 124, N. York, 1955.
- 3) HARRIS, G., y NEAL, G. E., *Biochim. et Biophys. Acta* 43, 197, 1960.
- 4) DAVIS, J. W., y HARRIS, G., *Biochim. et Biophys. Acta* 45, 28, 1960.
- 5) ORLA-JENSEN, S., *The lactic acid bacteria*, p. 84, Copenhagen, 1949.
- 6) HURLBERT, R. B., SCHMITZ, H., BRUMM, A. F. y POTTER, V. R., *J. Biol. Chem.* 209, 23, 1954.
- 7) PONTIS, H. G., CABI, E., y LELOIR, L. F., *Biochim. et Biophys. Acta* 26, 146, 1957.
- 8) CAPUTTO, R., LELOIR, L. F., CARDINI, C. E., y PALADINI, A. C., *J. Biol. Chem.* 184, 333, 1950.
- 9) HARRIS, G., DAVIS, J. W., y PARSONS, R., *Nature* 182, 1565, 1958.
- 10) LIEBERMAN, I., KORNBERG, A., y SIMMS, E. S., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2844, 1954.
- 11) HARRIS, G., y NEAL, G. E., *Biochim. et Biophys. Acta* 43, 197, 1960.
- 12) JACO, F., y MONO, J., *J. Mol. Biol.* 3, 318, 1961.
- 13) RÓBICHON-SZULMAJSTER, H., *Science* 127, 28, 1958.
- 14) STANIER, R. Y., *Bacteriol. Rev.* 14, 179, 1950.
- 15) MONOD, J., COHEN-BAZIRE, G., y COHN, M., *Biochim. et Biophys. Acta* 7, 585, 1951.
- 16) PARDEE, A. B., *J. Bact.* 73, 376, 1956.