

BBA 65571

STUDIEN ZUR OSCILLATION DER SYNTHESGESCHWINDIGKEIT VON NAD-ABHÄNGIGER GLUTAMATDEHYDROGENASE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

KLAUS PANTEN*, WOLFGANG BERNHARDT UND HELMUT HOLZER

Biochemisches Institut der Universität, Freiburg im Breisgau (Deutschland)

(Eingegangen am 11. November, 1966)

SUMMARY

Oscillatory phenomena in the rate of synthesis of NAD-dependent glutamate dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae

1. Further data on oscillatory phenomena in the rate of enzyme synthesis of NAD-dependent glutamate dehydrogenase (L-glutamate:NAD⁺ oxidoreductase (deaminating), EC 1.4.1.2) in *Saccharomyces cerevisiae* during derepression by transfer from an NH₄⁺-containing medium to a glutamate medium are reported. The growth rate of the cells indicates a high intracellular level of NH₄⁺ when the enzyme reaches maximum activity in the course of an oscillation. This causes repression, whereby a new period of oscillation is started. Synchronous growth as the reason for the oscillations is excluded.

2. Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2), whose rate of synthesis is also influenced by NH₄⁺, shows different kinetics of derepression from NAD-glutamate dehydrogenase. Enzymes whose syntheses are not controlled by NH₄⁺ (*viz.* NADP-glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4), glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49)) show no rhythmic changes in the rate of their syntheses.

3. Further evidence is presented for the function of NH₄⁺ as the corepressor of NAD-dependent glutamate dehydrogenase. The final level to which the specific activity of this enzyme is adjusted during derepression is controlled by the velocity of NH₄⁺ formation from glutamate in the cells.

EINLEITUNG

Die Synthese der NAD-abhängigen Glutamatdehydrogenase (L-Glutamat:NAD⁺ oxidoreductase (deaminierend), EC 1.4.1.2) von *Saccharomyces cerevisiae*¹ wird durch Zusatz von Ammoniumsalzen zum Nährmedium reprimiert^{2,3}. Bringt

* Ein wesentlicher Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche ist der Dissertation von K.P. an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg im Breisgau, 1967, entnommen.

man auf einem NH_4^+ -haltigen Medium gewachsene, reprimierte Zellen in ein NH_4^+ -freies Wachstumsmedium, so beobachtet man im Zuge der 'Derepression' eine rasche Synthese von NAD-Glutamatdehydrogenase. Die spezifische Aktivität des Enzyms durchläuft ein Maximum und stellt sich dann auf ein neues stationäres Niveau ein. Eine genauere Analyse der Kinetik des Derepressionsvorganges ergibt, daß die zeitliche Änderung der Enzymsynthesegeschwindigkeit eine gedämpfte Schwingung beschreibt, die nach etwa 24 h zur Ruhe kommt⁴⁻⁶. Als Ursache für die Oscillation diskutieren wir einen mit Verzögerung funktionierenden Regelkreis, der aus folgenden Gliedern besteht: DNA, messenger RNA, NAD-Glutamatdehydrogenase, NH_4^+ -Lieferung aus Glutamat, NH_4^+ -verbrauchende Reaktionen, durch NH_4^+ aktivierbarer Aporepressor der Bildung von NAD-Glutamatdehydrogenase. In der vorliegenden Arbeit teilen wir weitere Experimente zur Analyse dieses Regelkreises mit.

METHODEN UND PRÄPARATE

Chemikalien und Hefe (R 59 Ephrussi) sind dieselben, wie in einer früheren Arbeit⁶ angegeben. Anzucht und Aufschluß der Zellen sowie Aktivitätsbestimmungen und Definition der Aktivitätseinheiten sind ebenfalls bei Lit. 6 angegeben. Bestimmung von Glucose-6-phosphatdehydrogenase siehe Lit. 7, Glutaminsynthetase siehe Lit. 8. Amid-Stickstoff (siehe Lit. 9) und Glutamat (siehe Lit. 10) wurden im Trichloressigsäureextrakt aus abzentrifugierten Zellen bestimmt. Bei allen Versuchen wurden die Zellen im 'stufenweisen Turbidostat', entsprechend Fig. 1 bei Lit. 6, im exponentiellen Wachstum gehalten. Die Verarmung vor der zur Zeit Null beginnen den NH_4^+ -Derepression erfolgte, wie in Fig. 3 bei Lit. 6 angegeben.

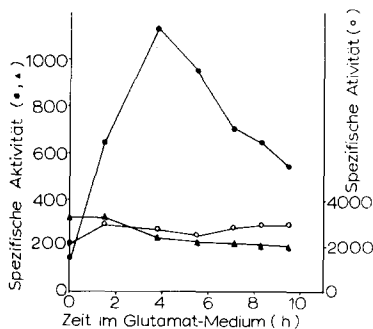


Fig. 1. Spezifische Aktivität verschiedener Enzyme bei der NH_4^+ -Derepression von NAD-Glutamatdehydrogenase. ●—●, NAD-Glutamatdehydrogenase; ○—○, NADP-Glutamatdehydrogenase; ▲—▲, Glucose-6-phosphatdehydrogenase.

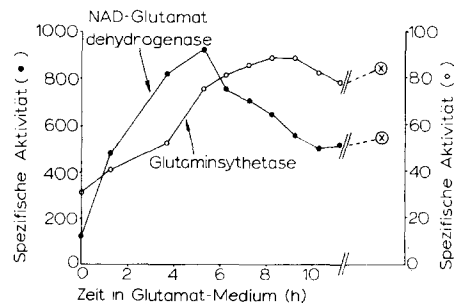


Fig. 2. NAD-Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthetase bei der NH_4^+ -Derepression. ⊗, Stationärer Wert der spezifischen Aktivität bei exponentiellem Wachstum im Glutamat-Medium (vgl. Lit. 11).

ERGEBNISSE

Es liegt nahe, als Ursache bzw. Anstoß ('pacemaker') für die Oscillation der

* Es handelt sich nicht, wie bei Lit. 6 angegeben, um einen 'Chemostat', sondern um einen 'Turbidostat', da die Wachstumskontrolle durch turbidimetrische Messungen erfolgt.

zeitlichen Änderung der Enzymsynthese Synchronisation des Wachstums zu vermuten. In früheren Versuchen haben wir eine Synchronisation auf Grund von Bestimmungen der Zellzahl ausgeschlossen⁶. Fig. 1 zeigt einen weiteren Versuch, der Synchronisation unwahrscheinlich macht. Kurve (●—●) gibt den charakteristischen 'overshoot' der NAD-Glutamatdehydrogenase nach Derepression wieder. In den Kurven (○—○) und (▲—▲) sind die gleichzeitig gemessenen spezifischen Aktivitäten von NADP-Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.4) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49) wiedergegeben. Diese Enzyme zeigen keinerlei periodisches Verhalten. Es liegt demnach keine generelle rhythmische Enzymsynthese vor.

In engem Zusammenhang mit der Regulation der NAD-Glutamatdehydrogenase steht die Regulation der Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2). Die Synthese dieses Enzyms wird ebenso wie diejenige der NAD-Glutamatdehydrogenase durch Zusatz von NH_4^+ zum Nährmedium reprimiert⁸; wahrscheinlich fungiert hierbei NH_4^+ (oder eine nahe verwandte Substanz) als gemeinsamer Corepressor⁸. Eine Repression durch Glutamin kann für beide Enzyme aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden (vgl. Tabelle I). Sehr hohe Enzymgehalte der Zellen findet man bei Wachstum auf Methionin, sehr geringe bei Wachstum auf NH_4^+ ; in beiden Fällen

TABELLE I

INTRAZELLULÄRE GLUTAMIN-KONZENTRATION UND SPEZIFISCHE AKTIVITÄT VON NAD-GLUTAMAT-DEHYDROGENASE UND GLUTAMINSYNTHETASE BEI EXPONENTIELLEM WACHSTUM IN MEDIEN MIT VERSCHIEDENEN STICKSTOFFQUELLEN

Stickstoff- quelle	Glutamin- Konzentration (10^{-3} M)	Spezifische Aktivität	
		NAD- Glutamat- dehydro- genase	Glutamin- synthetase
NH_4^+	10–20	100–200	15–30 (16*)
Glutamat	50–70	400–600	70–85 (60*)
Methionin	10–20	900–1100	— (120*)

* Siehe Lit. 8.

ist die intrazelluläre Konzentration an Glutamin niedrig; bei Wachstum auf Glutamat findet man hohe Enzymgehalte und zugleich eine hohe Glutamin-Konzentration.

In Fig. 2 ist das Verhalten von Glutaminsynthetase im Vergleich zu NAD-Glutamatdehydrogenase bei der Derepression eingetragen. Der bei langdauernder Kultur im 'stufenweisen Turbidostat' sich einstellende Wert der spezifischen Aktivität ist mit einem Kreuz angegeben. Die beiden Enzyme verhalten sich verschieden. NAD-Glutamatdehydrogenase zeigt einen kräftigen overshoot mit einem Maximum nach etwa 5 h; nach 10 h hat sich der für exponentielles Wachstum stationäre Wert eingestellt. Glutaminsynthetase zeigt einen nur geringen overshoot. Das Maximum wird erst nach etwa 9 h erreicht und hat etwa denselben Wert wie die spezifische Aktivität bei langdauerndem, exponentiellem Wachstum. Das verschiedene Verhalten der beiden Enzyme könnte darauf hindeuten, daß NH_4^+ nicht der gemein-

same Corepressor ist. Die Beobachtung des intrazellulären Glutamins während der Enzymderepression gibt keinen weiteren Aufschluß; unter unseren Versuchsbedingungen ist nach etwa 8 h ein Konzentrationsmaximum erreicht (vgl. Fig. 3). Zu diesem Zeitpunkt durchschreitet auch die Glutaminsynthetase ihr Maximum (vgl. Fig. 2). — Bestimmung des intrazellulären NH_4^+ könnte zur weiteren Klärung der Zusammenhänge beitragen. Es ist uns bisher nicht gelungen, eine genügend empfindliche und spezifische Methode auszuarbeiten. Es muß festgehalten werden, daß die verschiedenen Derepressionskinetik von Glutaminsynthetase und NAD-Glutamatdehydrogenase auch im Einklang mit der Existenz eines gemeinsamen Corepressors erklärt werden könnte. Hierbei kämen z.B. verschiedene Lebenszeit der jeweiligen messenger RNA oder verschiedene Affinität der Operatorgene zum gemeinsamen Holorepressor in Frage.

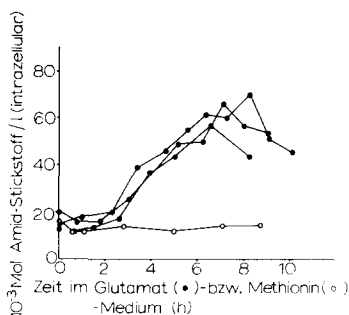


Fig. 3. Intrazelluläre Konzentration von Amid-Stickstoff bei der NH_4^+ -Derepression. ●—●, bei Wachstum auf Glutamat; ○—○, bei Wachstum auf Methionin. Da unter unseren Versuchsbedingungen $> 90\%$ des Säureamids Glutamin ist¹¹, wurde nicht Glutamin, sondern Säureamid bestimmt.

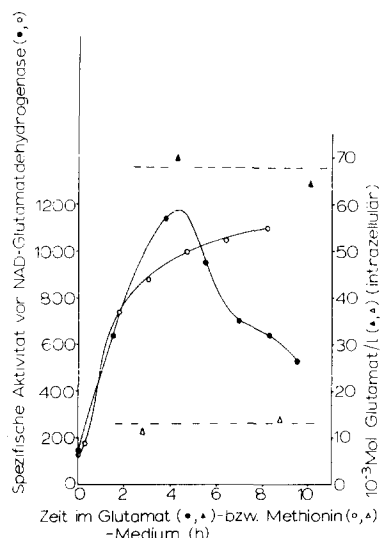


Fig. 4. NAD-Glutamatdehydrogenase bei der NH_4^+ -Derepression im Glutamat-Medium (●—●) und Methionin-Medium (○—○). ▲---▲, intrazelluläre Konzentration von Glutamat bei der Derepression im Glutamat-Medium; △---△, dito bei der Derepression im Methionin-Medium.

Unsere früheren Versuche⁶ hatten zu der Anschauung geführt, daß die durch NH_4^+ -Lieferung (insbesondere aus Glutamat) und NH_4^+ -Verbrauch bedingte stationäre Konzentration an NH_4^+ die Synthesegeschwindigkeit von NAD-Glutamatdehydrogenase reguliert. Der in Fig. 4 wiedergegebene Versuch ist eine weitere Stütze hierfür. Dereprimiert man auf NH_4^+ gezüchtete und 3 h lang verarmte Zellen in einem Medium mit Methionin als einziger Stickstoffquelle, so beobachtet man im Gegensatz zum Glutamat-Medium keinen overshoot, sondern asymptotische Annäherung der spezifischen Aktivität von NAD-Glutamatdehydrogenase an den für exponentielles Wachstum charakteristischen stationären Wert. Wie man weiter aus

Fig. 4 ersieht, ist beim Wachstum mit Glutamat die Glutamat-Konzentration in den Zellen etwa fünfmal höher als beim Wachstum mit Methionin. Die Michaelis-Konstante der NAD-Glutamatdehydrogenase mit Glutamat beträgt $25 \cdot 10^{-3}$ M (Lit. 1). Daher ist das Enzym bei Wachstum auf Glutamat gesättigt, während bei Wachstum auf Methionin die Glutamat-Konzentration nur $\frac{1}{2}$ der Michaelis-Konstante beträgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also im Methionin-Medium nur $\frac{1}{4}$ derjenigen im Glutamat-Medium. Die viermal schnellere NH_4^+ -Lieferung aus Glutamat bei Derepression im Glutamat-Medium im Vergleich zum Methionin-Medium führt (1) zu einem raschen Zurückdrängen der Synthese von NAD-Glutamatdehydrogenase, das heisst zu einem steilen overshoot, und (2) zu einem wesentlich niedrigeren stationären Wert der spezifischen Aktivität von NAD-Glutamatdehydrogenase bei kontinuierlichem, exponentiellem Wachstum.

TABELLE II

GENERATIONSZEIT VON *S. cerevisiae* R 59 IN MEDIEN MIT GLUTAMAT BZW. GLUTAMAT *plus* NH_4^+ Konzentration an Glutamat bzw. NH_4^+ je 0.01 M.

Stickstoffquelle	Generationszeit (h)	Zahl der Versuche
Glutamat	4.5	5
Glutamat + NH_4^+	3.1	2

Auch die Glutaminsynthetase ist im Glutamat-Medium mit Glutamat gesättigt (Michaelis-Konstante $9.4 \cdot 10^{-3}$ M (Lit. 8), während der Glutamat-Spiegel bei Wachstum auf Methionin zur Sättigung nicht ausreicht (Fig. 4). Dementsprechend stellt sich auf Methionin der intrazelluläre Glutamin-Spiegel niedrig ein im Vergleich zum Glutamat-Medium (Fig. 3). Der overshoot der NAD-Glutamatdehydrogenase wird demnach im Glutamat-Medium weiter dadurch begünstigt, daß Glutaminsynthetase unter diesen Bedingungen rasch NH_4^+ verbraucht, wodurch besonders kräftige Derepression eintritt.

Daß beim Wachstum auf Glutamat als einziger Stickstoffquelle die Geschwindigkeit der Produktion von NH_4^+ auch für die Generationszeit maßgebend ist, ergibt sich aus den in Tabelle II wiedergegebenen Daten. Zusatz von NH_4^+ zu Glutamat erniedrigt die Generationszeit von 4.5 auf 3.1 h. Im Einklang damit zeigt Fig. 5,

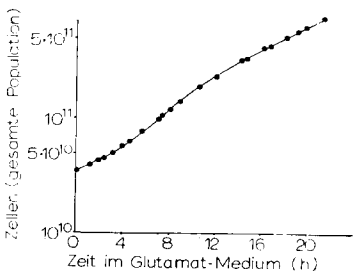


Fig. 5. Logarithmische Wachstumskurve von *S. cerevisiae* R 59. Die Zellzahl wurde wie früher beschrieben⁶ bestimmt. Zur Zeit Null wurden die Zellen vom NH_4^+ -Medium auf Glutamat-Medium umgesetzt.

daß die Wachstumsgeschwindigkeit dereprimierter Zellen unter denselben Bedingungen wie bei den Versuchen der Fig. 1–4 (im Glutamat-Medium) nach etwa 4 h ihren maximalen Wert erreicht. Dies ist die Zeit, zu der die NH_4^+ aus Glutamat liefernde NAD-Glutamatdehydrogenase in höchster Konzentration vorhanden ist (vgl. Fig. 1, 2, und 4). Nach etwa 10 h geht die Wachstumsgeschwindigkeit wieder auf einen niedrigeren Wert zurück. Dies ist der Zeitpunkt, zu dem auch die spezifische Aktivität der NAD-Glutamatdehydrogenase auf den niedrigeren stationären Wert für exponentielles Wachstum im Glutamat-Medium zurückgefallen ist (vgl. Fig. 2). Diese Überlegung gilt nicht ohne weiteres auch für das Wachstum auf anderen Stickstoffquellen als Glutamat. Bei anderen Stickstoffquellen können andere Reaktionen als die NH_4^+ -Lieferung aus Glutamat kontrollierend für die Generationszeit sein.

DISKUSSION

Das verschiedene Zeitverhalten von NAD-Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthetase bei der Derepression kann auf verschiedene Natur der Corepressoren zurückzuführen sein. Dies muß jedoch nicht der Fall sein, da wir¹² z.B. bei der Derepression von vier verschiedenen durch Arginin reprimierbaren Enzymen in *Escherichia coli* ein völlig verschiedenartiges Zeitverhalten der spezifischen Aktivität gefunden haben, obwohl hier Arginin der gemeinsame Corepressor ist. Erst eine weitere Analyse der vielen Faktoren, die am Auftreten von overshoot und gedämpfter Oscillation beteiligt sein können (Halblebenszeit der messenger RNA, Affinität von Corepressoren zu Aporepressoren, Affinität von Holorepressoren zu Operatorgenen etc.) wird hier Aufklärung bringen.

Für NAD-Glutamatdehydrogenase aus Hefe ist die Regulation der Synthesegeschwindigkeit durch NH_4^+ sehr wahrscheinlich. Dafür sprechen unsere früheren Versuche über die spezifische Aktivität des Enzyms bei Wachstum auf verschiedenen Stickstoffquellen³, sowie der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen der Synthesegeschwindigkeit des Enzyms und der Geschwindigkeit der NH_4^+ -Bildung aus Glutamat (vgl. Fig. 4).

Die früher postulierte biologische Bedeutung der NAD-Glutamatdehydrogenase für die NH_4^+ -Lieferung aus Glutamat^{3,13,14} wird durch die vorliegenden Versuche erhärtet. Insbesondere die Beobachtung, daß eine hohe NAD-Glutamatdehydrogenase-Konzentration dieselbe gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit im Glutamat-Medium ermöglicht wie ein Zusatz von NH_4^+ , spricht für diese Auffassung.*

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Studium der Bedingungen wird fortgesetzt, unter denen die Synthesegeschwindigkeit von NAD-abhängiger Glutamatdehydrogenase (L-Glutamat:NAD oxidoreductase (deaminierend), EC 1.4.1.2) in *Saccharomyces cerevisiae* bei Derepression durch Wechsel vom NH_4^+ -Medium zum Glutamat-Medium oszilliert. Aus der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen läßt sich schließen, daß ein besonders hoher intrazellulärer NH_4^+ -Spiegel vorhanden ist, wenn das Enzym im Zuge der Oscillation ein Maximum der Aktivität erreicht. Hierdurch setzt Repression ein, welche die

* Einen Hinweis auf diesen Zusammenhang verdanken wir Herrn Prof. Dr. H. L. KORNBERG (Leicester).

nächste Schwingung der Oscillation einleitet. Synchrones Wachstum konnte als Ursache für die Oscillation ausgeschlossen werden.

2. Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2), deren Synthesegeschwindigkeit ebenfalls von NH_4^+ beeinflusst wird, folgt bei der Derepression einer anderen Kinetik als NAD-Glutamatdehydrogenase. Enzyme, deren Synthese nicht von NH_4^+ reguliert wird (NADP-Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.4), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49)), zeigen keine rhythmische Änderung der Synthesegeschwindigkeit.

3. Es ergeben sich weitere Hinweise dafür, daß NH_4^+ als Corepressor der NAD-abhängigen Glutamatdehydrogenase wirkt. Für den endgültigen Wert, auf den die spezifische Aktivität des Enzyms im Zuge der Derepression einreguliert wird, ist die Geschwindigkeit maßgebend, mit der in der Zelle NH_4^+ aus Glutamat gebildet wird.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung danken wir für Beihilfen, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben.

LITERATUR

- 1 H. HOLZER UND S. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 361.
- 2 H. HOLZER UND G. HIERHOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 329.
- 3 G. HIERHOLZER UND H. HOLZER, *Biochem. Z.*, 339 (1963) 175.
- 4 W. BERNHARDT, K. PANTEN UND H. HOLZER, *Angew. Chem.*, 76 (1964) 990.
- 5 W. BERNHARDT, K. PANTEN UND H. HOLZER, *Angew. Chem. Intern. Ed. Eng.*, 3 (1964) 803.
- 6 W. BERNHARDT, K. PANTEN UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 99 (1965) 531.
- 7 I. WITT, R. KRONAU UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 118 (1966) 522.
- 8 G. KOHLHAW, W. DRÄGERT UND H. HOLZER, *Biochem. Z.*, 341 (1965) 224.
- 9 H. STEGEMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 312 (1958) 255.
- 10 E. BERNT UND H. U. BERGMAYER, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 384.
- 11 K. PANTEN, *Dissertation*, Medizinische Fakultät der Universität, Freiburg im Breisgau, 1967.
- 12 CH. GÄRTNER, H. FEYERABEND, A. HOLLDORF UND H. HOLZER, Manuskript in Vorbereitung.
- 13 B. D. SANWAL UND M. LATA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1961/62) 404.
- 14 K. KATO, S. KOIKE, K. YAMADA, H. YAMADA UND S. TANAKA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 98 (1962) 346.