

Piruvato-carboxilasa de levadura

Javier Menéndez

División de Biotecnología Industrial. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600. Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: yeastlab@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Pyruvate carboxylase plays an important role in intermediary metabolism, catalyzing the formation of oxaloacetate from pyruvate and HCO_3^- . It thus provides oxaloacetate for gluconeogenesis and for replenishing tricarboxylic acid cycle for fatty acid, amino acid and neurotransmitter synthesis. The enzyme is highly conserved and it is found in a great variety of organisms including bacteria, yeasts, fungi and plants, as well as in higher organisms. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two structural genes for pyruvate carboxylase, which are regulated in different ways. On the other hand, *Pichia pastoris* has only one gene. This protein is a member of a group of biotin-dependent enzymes and the disruption of their coding genes results in the incapacity of the yeast to grow on a minimal medium containing glucose as the sole carbon source. This phenotype led to the isolation of mutants from these two yeasts, which are affected in the glucose repression of a series of genes.

Keywords: pyruvate carboxylase, promoters, *PYC1*, *PYC2*, yeast

Biotecnología Aplicada 1999;16:75-82

RESUMEN

La enzima piruvato-carboxilasa desempeña un papel importante en el metabolismo intermediario, al catalizar la síntesis de oxalacetato a partir de piruvato y HCO_3^- . Esta reacción suministra el oxalacetato necesario para la gluconeogénesis y para alimentar el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ya que algunos intermediarios del mismo se emplean como precursores en la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos y neurotransmisores. Esta enzima se encuentra altamente conservada entre diferentes especies y los genes codificantes de la misma han sido aislados de bacterias, levaduras, hongos, plantas, así como de eucariotas superiores. En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes codificantes de esta proteína, los cuales son regulados de manera diferencial. Por su parte, en *Pichia pastoris* se ha identificado solamente un gen. Esta proteína es miembro del grupo de las enzimas dependientes de biotina y la interrupción de la misma provoca un fenotipo de ausencia de crecimiento en medio mínimo cuando la glucosa se emplea como única fuente de carbono. Este fenotipo ha permitido el aislamiento, en estas dos levaduras, de mutantes en los que está afectada la represión por glucosa de una serie de genes.

Palabras claves: levadura, piruvato-carboxilasa, promotores, *PYC1*, *PYC2*

Introducción

Las levaduras han sido empleadas por el hombre desde hace varios siglos para la obtención de bebidas alcohólicas y la producción de diferentes alimentos (como el pan). En nuestros días, las levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, se emplean no sólo en diferentes industrias, sino también como modelos para el estudio de los mecanismos que controlan la expresión génica en los eucariotas.

Los principales mecanismos que existen para el control de la transcripción en eucariotas son la activación o la represión de la maquinaria transcripcional [1]. La disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo promueve la generación de señales que van desde la membrana citoplasmática hasta el núcleo, y las levaduras responden a estas señales produciendo cambios en la expresión de diferentes genes [2]. Estos microorganismos pueden usar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono, sin embargo, emplean preferentemente hexosas como la glucosa y la fructosa. Cuando la levadura dispone de estos compuestos en el medio, los mismos son metabolizados por la ruta glicolítica y van principalmente hacia la fermentación alcohólica [3]. El crecimiento en presencia de otras fuentes de carbono como el glicerol o el lactato, requiere condiciones aeróbicas y es dependiente de la funcionalidad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Algunos de los componentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos actúan como precursores en la biosíntesis de ácidos grasos, aminoácidos y neurotransmisores. La salida de componentes de este ciclo hacia otras rutas biosintéticas hace que el mismo deje de funcionar si no es alimentado. En las levaduras, existen dos rutas que llevan a cabo estas reacciones anapleróticas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Una de estas rutas es el ciclo del glioxilato, que da lugar a malato y succinato partiendo de acetil-CoA, y la otra es la producción de oxalacetato a partir del piruvato, reacción catalizada por la enzima piruvato-carboxilasa (Figura 1).

Hasta hace unos años, la ausencia de información acerca de la estructura de la enzima piruvato-carboxilasa frenó los esfuerzos que se venían realizando con el objetivo de comprender cómo funcionan y se regulan ésta y otras proteínas dependientes de biotina. Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de la estructura tridimensional y del mecanismo de acción de la enzima [4]. No obstante, el objetivo central de este trabajo versa sobre los genes codificantes de esta proteína en levaduras, el efecto fenotípico de su interrupción y sobre algunos aspectos que controlan su regulación, tanto a nivel catalítico, como de la síntesis de la enzima.

© 1999 Elfos Scientiae

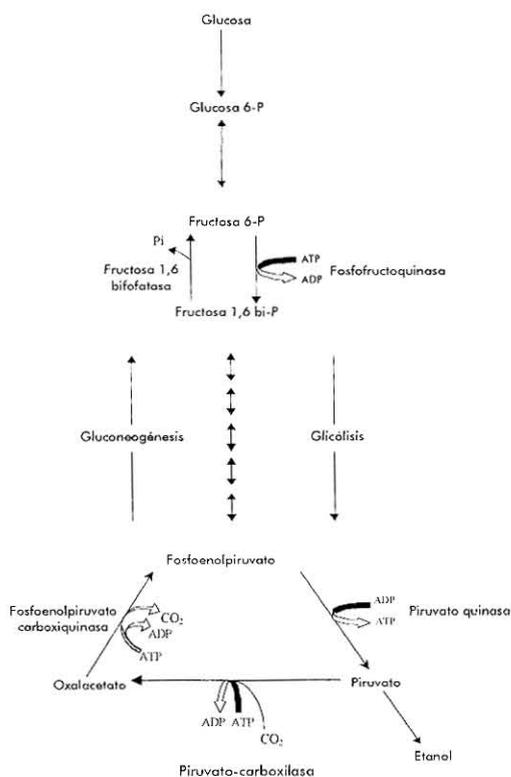


Figura 1. Esquema simplificado del metabolismo del carbono en levadura donde se presenta el paso metabólico catalizado por la enzima piruvato-carboxilasa.

La enzima piruvato-carboxilasa

La enzima piruvato-carboxilasa ha sido descrita en una amplia variedad de organismos que incluyen bacterias, levaduras, hongos, invertebrados, vertebrados y plantas [5, 6]. Esta enzima pertenece al grupo de las carboxilasas dependientes de biotina, que abarca la acetil-CoA-carboxilasa (EC 6.4.1.2), la 3-metil-crotonil-CoA-carboxilasa (EC 6.4.1.4) y la propionil-CoA-carboxilasa (EC 6.4.1.3). En el caso particular de la piruvato-carboxilasa, el grupo prostético, la biotina, está unido a la enzima mediante un enlace amida con un residuo de lisina [7]. El sitio activo de las carboxilasas dependientes de biotina se cree que consiste en dos subsitios separados espacialmente, donde la biotina actúa como un transportador móvil del grupo carboxilo (Figura 2). La biotina se carboxila en un subsitio y se transfiere al segundo donde la molécula aceptora, en este caso el piruvato, es carboxilada [8]. Mediante el empleo del complejo enzima-carboxibiotina y de análogos del piruvato, se ha visto también que la unión de este último a la enzima induce el movimiento de la carboxibiotina al sitio donde ocurre la segunda etapa de la reacción [9]. Es en este sitio donde la carboxibiotina se desestabiliza. Por lo tanto, la reacción completa se puede representar como la suma de dos etapas:

En la enzima purificada de diferentes especies incluyendo *S. cerevisiae*, el sitio catalítico queda dentro de una cadena polipeptídica simple, de un peso molecular aproximado de 113-130 kDa. La forma activa de la enzima está compuesta por cuatro



subunidades de este tipo, cada una de las cuales une una molécula de biotina [10].

Aislamiento de los genes que codifican la piruvato-carboxilasa de levadura

La primera secuencia completa publicada del gen codificante de la enzima piruvato-carboxilasa, fue la correspondiente al gen de *S. cerevisiae* [11]. Este gen, al que nombraron *PYCI*, se aisló utilizando una sonda de ADN radiactiva sintetizada a partir de la secuencia consenso para el dominio de unión de biotina. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma VII [12]. La secuencia de la proteína, deducida a partir de la secuencia de ADN, mostró que el mismo codifica una proteína de 1 178 aminoácidos.

Estos autores compararon parte de la secuencia de esta proteína con partes de las secuencias de otras enzimas dependientes de biotina cuyas funciones son bien conocidas, y con las de enzimas que tienen funciones y propiedades catalíticas similares, pero que no son dependientes de biotina. Como resultado de esta comparación (Figura 3) vieron que la región entre los aminoácidos 559 y 913 de la enzima de *S. cerevisiae* tiene considerable homología con la región amino terminal de la subunidad 5S de la transcaboxilasa (EC 2.1.3.1), correspondiente al dominio de unión de piruvato. También, encontraron un alto nivel de homología de la región comprendida entre los aminoácidos 353 y 468 con parte de la subunidad a de la propionil-CoA-carboxilasa humana y también con parte de la acetil-CoA-carboxilasa de pollo. Estas tres proteínas tienen en común la capacidad de unir ATP y HCO_3^- . La región comprendida entre los aminoácidos 157 y 333, mostró una gran similitud con la mitad amino terminal del dominio de unión de ATP de la enzima carbamil-fosfato-sintetasa. Finalmente, la comparación de los últimos 90 aminoácidos del extremo carboxílico de la enzima de levadura, mostró un alto grado de similitud con el dominio biotinilado de la enzima E2 de la piruvato deshidrogenasa de *Escherichia coli*.

En 1991, dos grupos de investigadores publicaron independientemente que en *S. cerevisiae* existe otro gen codificante de la piruvato-carboxilasa [13, 14].

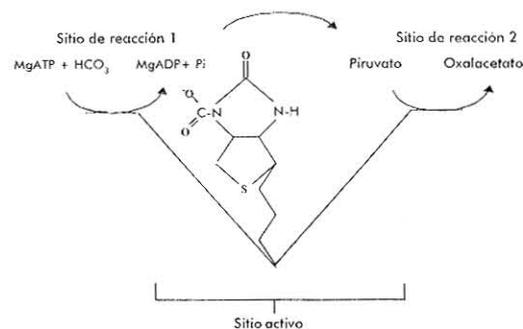


Figura 2. Esquema del sitio activo de una de las subunidades de la enzima piruvato-carboxilasa. En el esquema se muestra la forma en que el grupo prostético biotina actúa como transportador del grupo carboxilo desde el sitio de reacción 1 hasta el 2.

Este segundo gen, al que se le denominó *PYC2*, se aisló a partir de una genoteca, empleando como sonda radiactiva el gen *PYC1*. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma II [13]. Ambas isoenzimas tienen 90% de homología a nivel de secuencia de aminoácidos, tienen una localización citoplasmática y no presentan diferencias en los valores de K_m para el ATP y el piruvato. Sin embargo, la proteína codificada por el gen *PYC2* es más estable que la codificada por el gen *PYC1*, la cual pierde casi 100% de su actividad después de incubarse durante una noche a 4 °C [13].

Recientemente, se aisló el gen codificante de esta proteína en la levadura *Pichia pastoris* [15]. Para el aislamiento del mismo, se analizó la homología existente en varias regiones de esta proteína entre diferentes especies. Al gen aislado se le denominó *PpPYC1* y a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en la levadura *P. pastoris*, se demostró la existencia de un solo gen codificante de esta proteína. No está claro por qué unas especies presentan varias isoenzimas para una determinada función, mientras que otras sólo muestran una sola actividad. Se sabe que *S. cerevisiae* es un paradigma de genoma que se ha multiplicado parcialmente a partir de un genoma primitivo. Así, la secuenciación del genoma completo ha permitido mostrar que existen regiones enteras de un cromosoma que se hallan duplicadas en otro y que han sufrido alguna modificación en el curso de la evolución [16].

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen aislado de la levadura *P. pastoris*, mostró que éste presenta un marco abierto de lectura de 1 189 aminoácidos y, por lo tanto, tiene 12 y 5 aminoácidos más que la codificada por los genes *PYC1* y *PYC2* de *S. cerevisiae*, respectivamente. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADN del gen clonado, con las regiones codificantes de los genes *PYC1* y *PYC2* de *S. cerevisiae*, reveló que existe una homología de 84% con estas proteínas. A su vez, la identidad fue de 72% en el dominio de unión de ATP (dominio A, aminoácidos del 157 al 333; dominio B, aminoácidos del 353 al 488), mientras que la región menos conservada es aquella donde se une la biotina (aminoácidos del 1 089 al 1 178), que muestra 58% de identidad (Figura 4).

Regulación alostérica de la enzima

Uno de los aspectos de la función de la piruvato-carboxilasa que ha recibido mayor atención, es su regulación por acetil-CoA. En general, la actividad de la enzima de vertebrados es dependiente de acetil-CoA. La actividad de la enzima de procariontes muestra grados diferentes de dependencia de acetil-CoA; así, se ha observado que la enzima de *Pseudomonas citronellolis* no depende de éste [17], mientras que la de *Bacillus stearothermophilus* muestra una dependencia total [18]. En el caso de la enzima de hígado del pollo [19], así como en la de *Aspergillus nidulans* [20] se ha visto mediante microscopía electrónica, que el acetil-CoA tiene un efecto estabilizador sobre la estructura de la enzima.

Por su parte, la enzima de levadura es activa en ausencia de acetil-CoA, pues su actividad basal no depende de éste, sino de la presencia de iones potasio o de otros cationes monovalentes [21]. Sin embargo, el acetil-CoA tiene un efecto positivo sobre la activi-

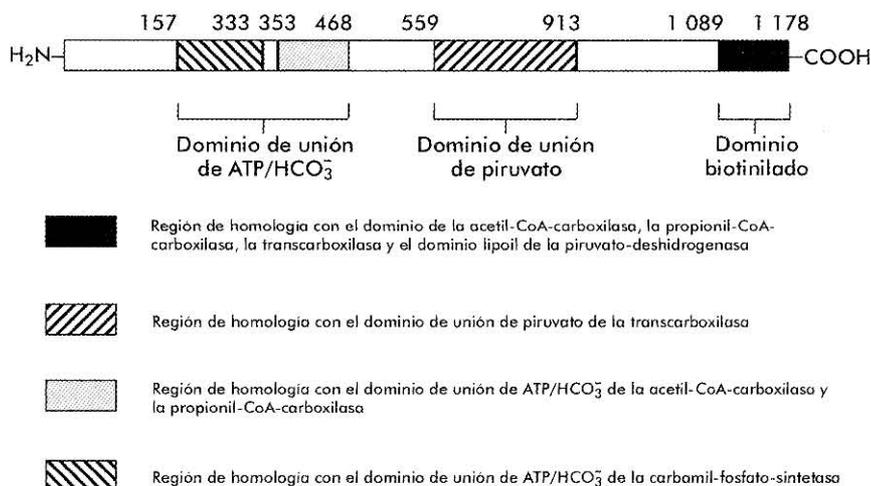


Figura 3. Representación esquemática de la estructura primaria de la enzima piruvato-carboxilasa de levadura. Se muestran las regiones de homología con otras enzimas relacionadas, basado en el trabajo de Lim y colaboradores [11].

dad de la enzima. A concentraciones saturantes de acetil-CoA ($K_a = 6,6$ mM), la actividad máxima que se obtiene es tres o cuatro veces mayor que cuando está ausente. El efecto activador del acetil-CoA, combustible del ciclo de los ácidos tricarbónicos, está en concordancia con la función anaplerótica de la enzima. Esta activación por acetil-CoA es inhibida competitivamente por el NADH, el cual, sin embargo, no afecta la actividad basal. Además del acetil-CoA, los acil-CoA de cadena larga son también potentes activadores de la enzima; de hecho, la K_a para el palmitoil-CoA es dos órdenes de magnitud menor que la del acetil-CoA [21]. En *S. cerevisiae*, la máxima actividad de la enzima depende, además, de la concentración relativa de los nucleótidos de adenina [22].

El aspartato, por otra parte, es un inhibidor no competitivo de la enzima ($K_i = 1,9$ mM), mientras que el oxalacetato muestra una inhibición competitiva con respecto al piruvato ($K_i = 0,22$ mM). La inhibición por aspartato parece ser un mecanismo de control específico, ya que otros ácidos dicarbónicos no producen una inhibición sustancial [22].

Regulación transcripcional de los genes codificantes de la enzima piruvato-carboxilasa de *S. cerevisiae*

Según se pudo apreciar en el acápite anterior, la enzima piruvato-carboxilasa es regulada alostéricamente y su síntesis parece ser constitutiva. Esto se ha visto al determinar la actividad en cultivos aeróbicos, tanto periódicos, como continuos, mediante el empleo de diferentes sustratos, en los que se observa que la actividad aumenta alrededor de dos veces [23, 24]. Por otra parte, en cultivos continuos crecidos en anaerobiosis y en condiciones en que la glucosa es limitante, la actividad es dos veces superior a la obtenida en condiciones aeróbicas [25, 26]. Por último, la adición de aspartato al medio de crecimiento reduce la actividad piruvato-carboxilasa en 50% en extractos de células dializadas.

En *S. cerevisiae*, existen dos genes codificantes de la enzima piruvato-carboxilasa [13, 14] que presentan

```

PpPYC1      ---MAEEDYLPVYQLRRDS-----SLLGTMNKILVANRGEIPIRIFRTAHELMSMNTV
PYC1_Sc     ---MSQRKFAGLRDNF-----NLLGEKNKILVANRGEIPIRIFRTAHELMSMNTV
PYC2_Sc     ---MSSSKKLAGLRDNF-----CLLGEKNKILVANRGEIPIRIFRTAHELMSMRTI
              * * * * *
PpPYC1      AIYSHEDRLSMHRLKADEAYVIGER----GQYSPVQAYLAIDEIKIAVKHNVNMIHPGYGFCSENS
PYC1_Sc     AIYSHEDRLSTHKQKADEAYVIGEV----GQYTPVGAYLAIDEIISIAQKHQVDFIHPGYGFLSENS
PYC2_Sc     AIYSHEDRLSMHRLKADEAYVIGEE----GQYTPVGAYLAMDEIIEIAKHKHVDFIHPGYGFLSENS
              * * * * *
PpPYC1      EFARKVEENGILWVGPSDVTVIDAVGDKVSARNLAYAANVPTVPGTPGPIEDVAQATAFVEEYGYPIVI
PYC1_Sc     EFADKVVKAGITWIGPPAEVIDSVGDKVSARNLAAKANVPTVPGTPGPIETVEEALDFVNEYGYPIVI
PYC2_Sc     EFADKVVKAGITWIGPPAEVIESVGDKVSARHLAARANVPTVPGTPGPIETVQEALDFVNEYGYPIVI
              * * * * *
PpPYC1      KAAFGGGGGRGMRVVREGDDIEDAFLRASSEAKTAFNGTGFIERFLDKPKHIEVQLLADNNGVNIHLF
PYC1_Sc     KAAFGGGGGRGMRVVREGDDVADAFQRATSEARTAFNGTGFVERFLDKPKHIEVQLLADNNGVNIHLF
PYC2_Sc     KAAFGGGGGRGMRVVREGDDVADAFQRATSEARTAFNGTGFVERFLDKPKHIEVQLLADKNGVNIHLF
              * * * * *
PpPYC1      ERDCSVQRRHQKVARNCSAKTLPEVVRNAIINDAVKLAKTANYRNAGTAEFLVDSQ-NRHYFIEINPR
PYC1_Sc     ERDCSVQRRHQKVVVEVAPAKTLPREVRDAILTDVAVKLAKECGYRNAGTAEFLVDNQ-NRHYFIEINPR
PYC2_Sc     ERDCSVQRRHQKVVVEVAPAKTLPREVRDAILTDVAVKLAKECGYRNAGTAEFLVDNQ-NRHYFIEINPR
              * * * * *
PpPYC1      IQVEHTITEEITGVDIVAAQIQIAAGA--SLEQLGLL-QEKITTRGFQAIQCRITTEDPTKQFQPTGK
PYC1_Sc     IQVEHTITEEITGVDIVAAQIQIAAGA--SLPQLGLF-QDKITTRGFQAIQCRITTEDPAKNFQPTGR
PYC2_Sc     IQVEHTITEEITGVDIVAAQIQIAAGA--TLTQLGLL-QDKITTRGFQAIQCRITTEDPSKNFQPTGR
              * * * * *
PpPYC1      IEVYRSSGGNGVRLDGGNGFAGAVISPHYDSMLVKCSTSGSNYEIRRRKMIRALVEFRIRGVKTNIPF
PYC1_Sc     IEVYRSAGGNGVRLDGGNGAYAGTIISPHYDSMLVKCSCSGSTYEIVRRKMIRALIEFRIRGVKTNIPF
PYC2_Sc     LEVYRSAGGNGVRLDGGNGAYAGATISPHYDSMLVKCSCSGSTYEIVRRKMIRALIEFRIRGVKTNIPF
              * * * * *
PpPYC1      LLALLTHPVFMTSECWTTTFIDDTPELFKILTSQNRAQKLLAYLGD LAVNGSSIKGQIGLPKLKHEADI
PYC1_Sc     LLTLLTNPVFIEGTYWGTTFIDDTPLQFQMVSSQNRAQKLLHYLADVADNGSSIKGQIGLPKLKSNPSV
PYC2_Sc     LLTLLTNPVFIEGTYWTTTFIDDTPLQFQMVSSQNRAQKLLHYLADLAVNGSSIKGQIGLPKLKSNPSV
              * * * * *
PpPYC1      PSITDING-----DVIDVSIPPP-DGWRQFLLEKGPQFAQQVRAFPPGLMIMD TTRDAHQSLLATR
PYC1_Sc     PHLHDAQG-----NVINVTKSAPPSGWRQVLEKGPFAEFARQVRQFNGTLLMD TTRDAHQSLLATR
PYC2_Sc     PHLHDAQG-----NVINVTKSAPPSGWRQVLEKGPCEFAKQVRQFNGTLLMD TTRDAHQSLLATR
              * * * * *
PpPYC1      VRTHDLLNIAPATSYALHHAFALECWGGATFDVSMRFLHEDPWQRLRKLKRAKAVPNIPFSMLLRGGNGV
PYC1_Sc     VRTHDLATIAPTTHAALAGAFALAEWCWGGATFDVAMRFLHEDPWQRLRKLRLSLVNPFPQMLLRGANGV
PYC2_Sc     VRTHDLATIAPTTHAALAGAFALAEWCWGGATFDVAMRFLHEDPWQRLRKLRLSLVNPFPQMLLRGATGV
              * * * * *
PpPYC1      AYSLSPADNIDHFLKQAKDT-GVDVFRVFDALNDIEQLKVGVDVAVKKAGGVVEATMCYSGDMLKPG-K
PYC1_Sc     AYSLSPADNIDHFVKQAKDN-SVDIFRVFDALNDLEQLKVGVDVAVKKAGGVVEATVCFSGDMLQPG-K
PYC2_Sc     AYSLSPADNIDHFVKQAKDN-GVDIFRVFDALNDLEQLKVGVDVAVKKAGGVVEATVCFSGDMLQPG-K
              * * * * *
PpPYC1      KYNLEYYYINLATEIIVEMGTHILAVKDMAGTLKPTAAKQLISALRRKFPSLPIHVHTHDSAGTVASMV
PYC1_Sc     KYNLDYYLEIAEKIVQMGTHTLGIKDMAGTMKPAKLLIGSLRAKYPDLPIHVHTHDSAGTRVASMT
PYC2_Sc     KYNLDYYLEVVEKIVQMGTHTLGIKDMAGTMKPAKLLIGSLRTRYPDLPPIHVHSHDSASTRVASMT
              * * * * *
PpPYC1      ACARAGADVVTVRVNSMSGMTSQPSMSAFIASLDG-EIETGIPEANAREIDAYWAEMRLLYSCFEADL
PYC1_Sc     ACALAGADVVDVAINSMSGMTSQPSINALLASLEG-NIDTGINVEHVRELDAYWAEMRLLYSCFEADL
PYC2_Sc     ACALAGADVVDVAINSMSGMTSQPSINALLASLEG-NIDTGINVEHVRELDAYWAEMRLLYPCFEADL
              * * * * *
PpPYC1      KGP--DPEVYQHEIPGGQLTNLLFQAQQVGLGKQVETKKAYEAANRLGDIIVKVTPTSKVVGD LAQF
PYC1_Sc     KGP--DPEVYQHEIPGGQLTNLLFQAQQVGLGQWAQTKRAYREANYLLGDIIVKVTPTSKVVGD LAKF
PYC2_Sc     KGP--DPEVYQHEIPGGQLTNLLFQAQQVGLGQWAETKRAYREANYLLGDIIVKVTPTSKVVGD LAQF
              * * * * *
PpPYC1      MVS NKLSSEDVERLASELDFFPDSVLDFFEGLMGTPYGGFPEPLRNTNIVSGKRRKLT SRPGLTLEPYNI
PYC1_Sc     MVS NKLTSDVRRRLANS LDFFPDSVMDFFEG LIGQPYGGFPEPLRSDVLRNKRRKLT CRPGLELEPFDL
PYC2_Sc     MVS NKLTSDDIRRLANS LDFFPDSVMDFFEG LIGQPYGGFPEPLRSDVLRNKRRKLT CRPGLELEPFDL
              * * * * *
PpPYC1      PAIREDLEARF-SKVTENDVASYNMYPKVEAYKKQQLYGDLSVLPTRNFLSPPKIDEERHVTIVTI
PYC1_Sc     EKIREDLQNRFGDVECDVASYNMYPVYEDFQKMRRETYGDLSVLPTRSFLSPLTDEE---IEVVI
PYC2_Sc     EKIREDLQNRFGDIDECDVASNNMYPVYEDFQKIRETYGDLSVLPTKNFLAPAEPDEE---IEVTI
              * * * * *
PpPYC1      ETRKTLIIKCMAEGELSQSSGTREVPFELNGEMRKTVTVEDKNG-AVETITRPKADAHNPN EIGAPMAG
PYC1_Sc     EQGKTLIIKQLQAVGDLNKKTGREVEYFDLNGEMRKRIRVADRSQ-KVETVTKSKADMHDPLHIGAPMAG
PYC2_Sc     EQGKTLIIKQLQAVGDLNKKTGQREVEYFELNGELRKRIRVADKSQ-NIQSVAKPKADVHDTHQIGAPMAG
              * * * * *
PpPYC1      VVVEVRVHENGVEVKKGDPIAVLSAMKMEMVISSPVAGRIGQIAVKENDSVSDASDLIPKSSRLSKLLMF
PYC1_Sc     VIVEVKVHKGSLIKKQPVAVLSAMKMEMVISSPSDQVKEVFSVDGENVDSSDLLVLLLEDQVPVETK
PYC2_Sc     VIEVKVHKGSLVKKGESIAVLSAMKMEMVSSPADGQVKDVFIRDGESVDASDLLVLEEEETLPPSP
              * * * * *
PpPYC1      IILIIILY
PYC1_Sc     A-----
PYC2_Sc     KKVIFTR
    
```

Figura 4. Comparación entre las secuencias aminoácidas deducidas para la enzima piruvato-carboxilasa de *S. cerevisiae* y *P. pastoris*.

una homología de 92% a nivel de secuencia de aminoácidos, pero sin alguna característica común en las regiones 5' no codificantes (Tabla 1). Este hecho parece indicar que existen diferencias en la regulación de la expresión de estos genes.

La expresión de los genes *PYC1* y *PYC2* en *S. cerevisiae* se estudió a lo largo del crecimiento de la levadura en medio mínimo y en medio rico, utilizando la glucosa o el etanol como fuentes de carbono [27]. Estos autores analizaron la expresión de la enzima, tanto en cepas que portan los dos genes, como en cepas que portan uno de ellos interrumpido. En sus condiciones experimentales, los autores observaron que ambos genes *PYC* se transcriben en cultivos crecidos en glucosa y en etanol, aunque los niveles de ARN mensajero son dependientes de la fuente de carbono empleada. En el caso específico de los cultivos crecidos en glucosa, se observó que el gen *PYC1* tenía una expresión constante, mientras que el gen *PYC2* se expresaba mayoritariamente en los estadios iniciales del crecimiento. En el caso de los cultivos crecidos en etanol, la expresión del gen *PYC1* fue superior a la del gen *PYC2*. Curiosamente, la expresión de *PYC1* en los cultivos crecidos en etanol también fue superior a la expresión obtenida en los cultivos crecidos en glucosa. Este resultado es sorprendente, ya que se ha visto que el ciclo del glioxilato es el encargado de aportar el oxalacetato necesario durante el crecimiento en presencia de compuestos de dos átomos de carbono [28]. Una explicación posible para este resultado pudiera ser que los niveles de ARN mensajero determinados en estos experimentos, son relativos a los niveles de ARN total. Estas diferencias observadas pudieran deberse, en parte, a diferencias en el contenido de ARN ribosomal en las células crecidas en presencia de glucosa o etanol [29].

Con el objetivo de corroborar los resultados descritos anteriormente [27], se aislaron las regiones 5' no codificantes de los genes *PYC1* y *PYC2* mediante reacción en cadena de la polimerasa y se fusionaron al gen reportero *lacZ* [30]. La funcionalidad del sistema de fusión al gen *lacZ* se comprobó midiendo la actividad β-galactosidasa en presencia de diferentes fuentes de carbono.

En las condiciones experimentales empleadas, la actividad obtenida a partir de la expresión bajo el control del promotor del gen *PYC1*, fue dependiente de la fuente de carbono. Se obtuvieron los mayores niveles de actividad β-galactosidasa en el medio con etanol, mientras que la obtenida a partir de la expresión bajo el control del promotor del gen *PYC2* no muestra variaciones significativas en las diferentes fuentes de carbono. Resulta curioso el patrón de expresión obtenido con el promotor del gen *PYC1*, el cual coincide con el resultado del grupo de Brewster [27]. Como se mencionó anteriormente, durante el crecimiento en presencia de compuestos de dos átomos de carbono, el ciclo del glioxilato parece ser el encargado de suministrar el oxalacetato necesario para el funcionamiento continuo del ciclo de Krebs, y la piruvato-carboxilasa aparece como innecesaria. En este sentido, se pueden mencionar los resultados de un estudio en el que un doble mutante $\Delta(pyc1, pyc2)$ es capaz de crecer en presencia de piruvato, ya que el ciclo del glioxilato está desreprimido [31]. No obstante, los resultados

Tabla 1. Secuencias en las regiones 5' no codificantes de los genes *PYC1* y *PYC2* que tienen homología con sitios potenciales de unión de proteínas reguladoras reportadas en *S. cerevisiae*. Tomado de Stucka y colaboradores [13].

Sitios de unión	Secuencias consenso	Secuencias en el gen	Genes
CDEI	RTCACRTG	GTCACGTG -488	<i>PYC1</i>
TRE	GGTCATGACC	GGTCATGACC -330	<i>PYC1</i>
		GGTCATGCTC -146	
ABF1/GF1	RTCRYNNNNNACG	GTCACTAACGACG -492	<i>PYC2</i>
GRF2/REB1	YNNYACCCG	CCCTTACCCG -476	<i>PYC2</i>
Bloque-CT	CTTCC	CTTCTGCGGAAG -403	<i>PYC2</i>
GCN4	TGACTC	TGACTC -278	<i>PYC2</i>

indican claramente que el ciclo del glioxilato, así como la reacción catalizada por la piruvato-carboxilasa, son esenciales para el suministro del oxalacetato necesario durante la gluconeogénesis. Sería interesante estudiar si la expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo del glioxilato influye de alguna manera en la del gen *PYC1*. Esto podría realizarse, por ejemplo, mediante la medición de los niveles de actividad piruvato-carboxilasa en cepas *icl1*.

Para identificar dentro de estos promotores las regiones responsables de su regulación, se realizaron delecciones seriadas de los mismos en el sentido 5'. Las delecciones obtenidas en el caso del promotor del gen *PYC1*, permitieron identificar dos regiones cuya eliminación tiene un efecto marcado sobre la transcripción del gen *lacZ* [30]. La primera delección actúa negativamente y fue identificada entre las posiciones -483 y -331 con respecto al ATG de iniciación. Un análisis de esta región del promotor, mostró que en la misma aparecen tres secuencias homólogas a la región represora URS1 del gen *CAR1*, el cual codifica la enzima arginasa [32]. Estas secuencias incluyen un núcleo central conservado de la secuencia 5'-CCGCC-3' y en particular, la comprendida entre -432 y -424 (5'-AGCCGCCCA-3'), es idéntica a una secuencia que aparece en los promotores de los genes *CHAI* [33] y *HOP1* [34]. Este URS ha sido identificado como regulador negativo de la transcripción de varios genes no relacionados entre sí (Tabla 2) y es capaz de unir una o varias proteínas en experimentos de retraso en gel. Bien pudiera ser que estas proteínas estuviesen implicadas en una forma de regulación negativa de la expresión del gen *PYC1*.

La segunda región identificada dentro del promotor *PYC1* se encuentra entre -330 y -298. Esta región actúa como un elemento activador de la transcripción (UAS), el cual parece ser necesario para la expresión del gen, tanto durante el crecimiento en presencia de glucosa, como durante el crecimiento en presencia de etanol. Además, este fragmento fue capaz de formar un complejo específico ADN-proteína cuando se empleó como sonda en experimentos de retraso en gel, en los que se utilizaron extractos nucleares preparados a partir de cultivos crecidos en condiciones de represión y desrepresión [30]. Sin embargo, este complejo desaparece cuando en estos experimentos se emplean extractos preparados a partir de cepas que presentan mutados los genes *rtg1* y *rtg2*. Estos genes participan en la regulación transcripcional de la enzima citrato sintasa no mitocondrial [35]. Curiosamente, también se ha demostrado que estas mutaciones disminuyen en 50% los niveles de actividad piruvato-carboxilasa [36].

Es interesante señalar que cepas de levaduras que tienen interrumpido uno de los dos genes *RTG1* y *RTG2* o ambos, no crecen en medio mínimo con glucosa o acetato como únicas fuentes de carbono, y son auxotróficas para aspartato o glutamato [35]. Este fenotipo es típico de células que presentan afectado el ciclo de los ácidos tricarbónicos o el ciclo del glioxilato. A su vez, ese mismo fenotipo es el que presentan las cepas en las que se ha eliminado la función de la piruvato-carboxilasa [13]. Por lo tanto, esas proteínas, bien directa o indirectamente, podrían estar implicadas en la regulación de la transcripción de al menos el gen *PYC1*.

En el caso de los elementos responsables de la transcripción del gen *PYC2*, los experimentos realizados permitieron identificar al menos una de las regiones necesarias para su regulación. En este caso, se vio que la región comprendida entre -417 y -291 es necesaria para la transcripción de este gen cuando la glucosa se emplea como fuente de carbono. No obstante, con esta región (entre -417 y -291), no se pudo obtener la formación de complejos específicos ADN-proteína [30]. El análisis de la secuencia de ADN de esta región del promotor *PYC2*, mostró que contiene dos secuencias repetidas del pentanucleótido 5'-CTTCC-3', al que se le denomina bloque CT. Este pentanucleótido ha sido descrito en el promotor del gen *PGK* [37], el cual contiene una región activadora compuesta de varios elementos entre los que se encuentran tres secuencias repetidas del mismo.

Por último, a pesar de que en la secuencia del promotor del gen *PYC2* existen varios sitios potenciales de unión de proteínas reguladoras (Tabla 1), la eliminación de estos sitios no provoca ninguna variación significativa de la actividad β -galactosidasa [30].

Defecto metabólico causado por la interrupción de los genes *PYC*

El efecto de la interrupción de los genes *PYC* en la cepa portadora de varias auxotrofías, W303, ha sido publicado previamente [13], y se ha observado que los mutantes que expresan sólo uno de los dos genes no mostraron ningún fenotipo evidente. Sin embargo, estos mismos autores reportaron que la interrupción de los dos genes produjo una cepa incapaz de crecer en medio mínimo que contiene glucosa como única fuente de carbono. El crecimiento de esta cepa deficiente en la enzima piruvato-carboxilasa, empleando glucosa como única fuente de carbono, fue posible solamente cuando se empleó aspartato como fuente de nitrógeno. Un fenotipo similar se ha reportado en un doble mutante $\Delta(pyc1, pyc2)$ obtenido en la cepa auxotrófica DBY746 [27]. Estos autores observaron un requerimiento parcial de aspartato en la cepa que tiene interrumpido solamente el gen *PYC1*, lo que sugiere que la contribución relativa de las isoenzimas a la actividad total es dependiente de la cepa.

En el caso de *P. pastoris*, se pudo observar que la interrupción del único gen de la piruvato-carboxilasa presente en esta levadura, produjo un fenotipo similar al encontrado en *S. cerevisiae* cuando se interrumpen los dos genes *PYC* [15]. En este caso, la adición de aspartato o glutamato permitió el crecimiento de la cepa que tiene el gen interrumpido, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, donde el glutamato no permite

Tabla 2. Homologías entre las regiones URS presentes en diferentes genes, con respecto a la región URS1 del gen *CAR1*.

Genes	URS	Homología	Referencias
<i>CAR1</i>	AGCCGCCGA - 158	9/9 - 146	32
<i>PYC1</i>	AACCGCCTG - 456	6/9 - 448	13
<i>PYC1</i>	AGCCGCCCA - 432	8/9 - 424	13
<i>PYC1</i>	GCCCGCCCT - 390	5/9 - 398	13
<i>HOP1</i>	AGCCGCCCA - 165	8/9 - 173	34
<i>CHA1</i>	AGCCGCCCA - 210	8/9 - 218	33
<i>DMC1</i>	AGCCGCCCA - 137	8/9 - 129	41
<i>SPO13</i>	AGCCGCCGA - 96	9/9 - 88	42
<i>MER1</i>	AGCCGCCGA - 111	9/9 - 103	43

el crecimiento cuando está presente la doble interrupción [13]. No está claro si esto es una particularidad de la cepa usada, o si está relacionado con alguna peculiaridad del transporte de aminoácidos en esa especie.

Aislamiento de mutaciones que suprimen el fenotipo en levaduras

La incapacidad que muestran las cepas de *S. cerevisiae* y *P. pastoris* deficientes en la actividad piruvato-carboxilasa, de crecer en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, se debe a que el ciclo del glioxilato no puede suplir el papel que realiza la piruvato-carboxilasa en esas condiciones. No obstante, se han aislado mutaciones supresoras, tanto en *S. cerevisiae* [31, 38], como en *P. pastoris* [15], que permiten el crecimiento en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Las mutaciones identificadas en *S. cerevisiae*, *BPC1-1* [31] y *DGT1-1* [38] son dominantes y alélicas entre sí.

En el caso específico de la mutación *DGT1-1*, se produce una disminución de la entrada de glucosa a la célula. Tal disminución del transporte de glucosa hacia el interior de la célula, al parecer disminuye la represión catabólica que ésta ejerce sobre una gran variedad de genes. Teniendo en cuenta que en levadura la única vía conocida que puede rellenar el ciclo de los ácidos tricarbónicos en ausencia de la enzima piruvato-carboxilasa es el ciclo del glioxilato [28], las bases moleculares de esta supresión parecen estar relacionadas con una afectación de la represión catabólica que se ejerce sobre el gen que codifica la enzima isocitrato liasa. Esta afectación en la represión permite la expresión del gen codificante de la isocitrato-liasa, en condiciones en las que normalmente está reprimido.

Estos autores determinaron la actividad isocitrato-liasa en las cepas portadoras de la mutación supresora, y tanto en *S. cerevisiae* [31, 38], como en *P. pastoris* [15], observaron que la enzima estaba desreprimida durante el crecimiento en presencia de glucosa. En todos los casos, estas mutaciones supresoras no fueron específicas sólo del ciclo del glioxilato, ya que ambas mutaciones producen la desrepresión de varios genes normalmente reprimidos

17. Taylor BL, Routman S, Utter MF. The control of synthesis of pyruvate carboxylase in *Pseudomonas citronellolis*. Evidence from double labeling studies. *J Biol Chem* 1975; 250:2376-82.
18. Sundaram TK, Cazzulo JJ, Kornberg HL. Anaplerotic CO₂ fixation in mesophilic and thermophilic bacilli. *Biochem Biophys* 1969; 192:355-7.
19. Mayer F, Wallace JC, Keech DB. Further electron microscopic studies on pyruvate carboxylase. *Eur J Biochem* 1980;112:265-72.
20. Osmani SA, Mayer F, Martson FAO, Selmes IP, Scrutton MC. Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*: effects of regulatory modifiers on the structure of the enzyme. *Eur J Biochem* 1984;139:509-18.
21. Myers DE, Tolbert B, Utter MF. Activation of yeast pyruvate carboxylase: interaction between acyl-Coenzyme A compounds, aspartate and substrates of reaction. *Biochem* 1983;22:5090-6.
22. Miller AL, Atkinson DE. Response of yeast pyruvate carboxylase to the adenylate energy charge and other regulatory parameters. *Arch Biochem Biophys* 1972;152:531-8.
22. Palacián E, de Torrontegui G, Losada M. Inhibition of yeast pyruvate carboxylase by L-aspartate and oxaloacetate. *Biochem Biophys Res Comm* 1966;24:644-9.
23. Divjak S, Mor JR. On the activity of carbon dioxide fixation in growing yeasts. *Arch Microbiol* 1973;94:191-99.
24. Haarasilta S, Taskinen L. Location of three key enzymes of gluconeogenesis in baker's yeast. *Arch Microbiol* 1977;113:159-161.
25. Haarasilta S, Oura E. Effect of aeration on the activity of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* growing under glucose limitation. *Arch Microbiol* 1975;106:271-3.
26. Oura E, Haarasilta S, Londesborough J. Carbon dioxide fixation by baker's yeast in a variety of growth conditions. *J Gen Microbiol* 1980;118:51-8.
27. Brewster NK, Val NK, Walker ME, Wallace JC. Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and non-fermentative growth. *Arch Biochem Biophys* 1994;311:62-71.
28. Schöler A, Schüller HJ. Structure and regulation of the isocitrate lyase gene (ICL1) from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1993;23:375-81.
29. Pronk JT, Steensma HY, van Dijken JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996;12:601-10.
30. Menéndez J, Gancedo C. Regulatory regions in the promoters of *Saccharomyces cerevisiae* PYC1 and PYC2 genes encoding isoenzymes of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiol Lett* 1998;2:345-352.
31. Blázquez MA, Gamo FJ, Gancedo C. A mutation affecting carbon catabolite repression suppresses growth defect in pyruvate carboxylase mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1995;377:197-200.
32. Luche RM, Sumrada R, Cooper TG. A cis-acting element present in multiple genes serves as a repressor protein-binding site for the yeast CAR1 gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10:3884-95.
33. Bornaes C, Ignjatovic MW, Schjerling P, Kielland-Brandt MC, Holmberg S. A regulatory element in the CHA1 promoter which confers inducibility by serine and threonine on *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Mol Cell Biol* 1993;13:7604-11.
34. Vershon AK, Hollingsworth NM, Johnson AD. Meiotic induction of the yeast HOP1 gene is controlled by positive and negative regulatory sites. *Mol Cell Biol* 1992;12:3706-14.
35. Liao X, Butow R. RTG1 and RTG2: Two genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 1993;72:61-71.
36. Small WC, Brouder RD, Sandor A, Fedorova N, Li G, Butow RA, et al. Enzymatic and metabolic studies on retrograde regulation mutants of yeast. *Biochem* 1995;34: 5569-76.
37. Chambers A, Stanway C, Kingsman AJ, Kingsman S. The UAS of the yeast PGK gene is composed of multiple functional elements. *Nucl Acids Res* 1988;16:8245-60.
38. Gamo FJ, Lafuente MJ, Gancedo C. The mutation DGT1-1 decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1994;176:7423-29.
39. Minehart PL, Magasanik B. Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 1991;11: 6216-28.
40. Hubbard EJA, Jiang R, Carlson M. Dosage dependent modulation of glucose-repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1994;14:1972-8.
41. Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N. DMCT1: a meiosis-specific yeast homologous of *E. coli recA* gene required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 1992;69:439-56.
42. Wang HT, Frackman S, Kowalyn J, Esposito RE, Elder RT. Developmental regulation of SPO13, a gene required for separation of homologous chromosomes at meiosis I. *Mol Cell Biol* 1987;7:1425-35.
43. Engebrecht J, Roeder GS. MER1, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination, is induced in meiosis. *Mol Cell Biol* 1990;10:2379-89.

Recibido en julio de 1998. Aprobado en octubre de 1998.

Diccionario de Farmacia

El Centro de Traducciones y Terminología Especializada del Instituto de Información Científica y Tecnológica de Cuba presenta esta obra, que cuenta con más de 21 000 entradas en español, con sus equivalentes en inglés y francés.

Se puede adquirir en soporte electrónico, con un sistema automatizado que permite la manipulación de los datos en Windows 95 o Windows NT.

Para más información diríjase a: Centro de Traducciones y Terminología Especializada
Instituto de Información Científica y Tecnológica
Capitolio Nacional
Industria y Barcelona
Ciudad de La Habana, Cuba
Tel: (53-7) 62 6531
Fax: (53-7) 62 6531; 70 4226
E-mail: ctte@ceniai.inf.cu