



Doctoral Thesis

## **Tryptophan-Synthese in *Saccharomyces cerevisiae* Regulation der Synthese-Leistung "in vivo"**

**Author(s):**

Miozzari, Giuseppe F.

**Publication Date:**

1976

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000187454> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 5698

**TRYPTOPHAN-SYNTHESE IN  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE  
REGULATION DER SYNTHESE-LEISTUNG  
" IN VIVO "**

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

GIUSEPPE F. MIOZZARI

dipl. Natw. ETH

geboren am 11. Februar 1947

von Uster (Kt. Zürich)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. R. Hütter, Referent

Prof. Dr. Th. Leisinger, Korreferent

aku-Fotodruck

Zürich

1976

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe von Mutanten und Analogon wurden gezielte Eingriffe in Ablauf und Regulation der Tryptophan-Biosynthese in Saccharomyces cerevisiae vorgenommen, mit dem Ziel, die an der Kontrolle der Synthese-Leistung "in vivo" beteiligten Mechanismen zu identifizieren.

Keines der 5 Enzyme der Tryptophan-Biosynthese wird in limitierender Menge synthetisiert. In Minimalmedium bleibt die Reduktion der Gendosis um 25, 50 und (bei 4 der 5 Enzyme) 75 % ohne Einfluss auf den Fluss durch den Tryptophan-Weg. Die Limitierung des Flusses erfolgt durch Feedback-Hemmung der Anthranilat-Synthase (AA-Synthase), des ersten Enzyms des Synthese-Weges. Das Enzym wird sowohl "in vitro" als auch "in vivo" durch L-Tryptophan in seiner Aktivität gehemmt. Die Feedback-Sensitivität des Enzyms ist abhängig von der Grösse des Chorisminsäure-Pools, da Chorisminsäure, das Substrat der Enzymreaktion, die Anlagerung des Inhibitors zu hemmen vermag. Es wurden Anzeichen gefunden für eine Beteiligung von Tryptophan an der Regulation des Chorisminsäure-Pools.

Der Tryptophan-Pool ist mit 0.07 nMol/mg Trockengewicht für Wildtypzellen auf Minimalmedium sehr klein; er bewirkt bei der Wachstumsrate des Wildtyps eine 75 - 80 %ige Hemmung der Aktivität der AA-Synthase. Der resultierende Fluss durch den Tryptophan-Weg entspricht der Geschwindigkeit des Verbrauchs der Aminosäure in der Proteinsynthese. Weder eine Erhöhung der Enzymkonzentrationen in dereprimierten Zellen, noch deren Verminderung bei reduzierter Gendosis haben einen wesentlichen Einfluss auf die Synthese-Leistung. Ihre Auswirkungen beschränken sich ebenso wie diejenigen einer Veränderung des Chorisminsäure-Pools auf eine leichte Verschiebung in der Grösse des Tryptophan-Pools.

Tryptophan-Limitierung in Mutanten oder durch Indolacrylsäure

bewirkt eine vollständige Aufhebung der Feedback-Hemmung der AA-Synthase. Die ungehemmte Kapazität des Syntheseweges beträgt etwa das 3fache der Synthese-Leistung, welche für die Aufrechterhaltung der Wachstumsrate des Wildtyps auf Minimalmedium notwendig ist. Diese maximale Kapazität wird durch das 2. Enzym (Phosphoribosyl-Transferase) limitiert, welches von allen Tryptophan-Enzymen im kleinsten Ueberschuss synthetisiert wird.

Neben der Aufhebung der Feedback-Hemmung der AA-Synthase hat Tryptophan-Limitierung eine Derepression von 4 der 5 Tryptophan-Enzyme zur Folge. Die Erhöhung der Enzymaktivität wird durch eine Reduktion der Beladung von  $tRNS^{TRP}$  ausgelöst und ist unabhängig von der Grösse des Tryptophan-Pools. Der erhöhten Aktivität der Tryptophan-Enzyme "in vitro" entspricht eine 2 - 3fache Steigerung des theoretisch möglichen Flusses durch den Tryptophan-Weg "in vivo". Die Derepression der Tryptophan-Enzyme ist jedoch unspezifisch und erfolgt im Rahmen der "allgemeinen Regulation der Aminosäure-Biosynthese". Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist eine Beteiligung des Derepressions-Mechanismus an der spezifischen Regulation des Flusses durch den Tryptophan-Weg unwahrscheinlich.

Aufgrund ihrer Auswirkungen auf Wachstum, Proteinsynthese und Enzymaktivitäten im Wildtyp sowie in verschiedenen Mutanten konnte die Wirkungsweise der Tryptophananalogen 4-Methyl-Tryptophan, 5-Methyl-Tryptophan und 5-Fluor-Tryptophan, sowie der Indolanalogen 5-Fluor-Indol und Indolacrylsäure ermittelt werden.

Für die Messung der Enzymaktivitäten "in vitro" wurde eine Permeabilisationsmethode entwickelt, welche eine zuverlässige Bestimmung aller Tryptophan-Enzyme bei relativ geringem Aufwand an Zeit und Material erlaubt.

S U M M A R Y

This report presents an analysis of the mechanisms involved in the control of the flux to tryptophan in Saccharomyces cerevisiae.

All of the typtophan biosynthetic enzymes are synthesized in excess. The flux through the pathway is adjusted to the rate of protein synthesis through feedback inhibition of the first enzyme by the endproduct tryptophan. Increasing or lowering the concentration of individual enzymes, or of chorismate, the first substrate of the pathway, has no noticeable influence on the overall flux to tryptophan.

Tryptophan limitation relieves feedback inhibition of the first enzyme and uncovers the uninhibited synthetic capacity of the pathway, which exceeds the rate of consumption of the amino acid by a factor of three. In addition, tryptophan limitation causes derepression of 4 of the 5 tryptophan-enzymes. Although it does not appear to serve as an instrument for the specific regulation of the flux to tryptophan, this derepression entails a two- to three-fold increase in the synthetic capacity of the pathway.

A number of tryptophan- and indole-analogues were analyzed as to their effects "in vivo". A method was developed for the determination of enzyme activities in permeabilized cells.