

UDK 663.12:577.121:547.455.623
ISSN 0352-9193

review

Utjecaj glukoze na energetski metabolizam kvasca – represija glukozom i katabolička inaktivacija

Glucose Effect on Energetic Metabolism of Yeast – Glucose Repression and Catabolite Inactivation

S. Novak i V. Marić

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno 15. 1. 1993.

Prihvaćeno 18. 2. 1993.

Sažetak

Prisutnost glukoze u okolini kvašćeve stanice uzrokuje prestanak uporabe drugih izvora ugljika u stanici. Ta pojava nastaje zbog djelovanja dvaju regulacijskih mehanizama. Prvi mehanizam, represija glukozom ili katabolička represija, odvija se na razini sinteze enzima, tako da glukoza sprečava transkripciju gena odgovornih za metabolizam drugih izvora ugljika. Drugi mehanizam, katabolička inaktivacija, dovodi do inaktivacije enzima u stanici ako nisu potrebni ili bi bili štetni za stanicu.

Intenzivna istraživanja posljednjih godina bitno su proširila znanja o ova dva regulacijska mehanizma upućujući na njihovu osobitu složenost na molekularnoj razini. Stoga ne čudi da su neki bitni elementi još uvijek nepoznati.

Uvod

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* poznat je po tome što brzo fermentira mnoge ugljikohidrate, a u aerobnim uvjetima može rasti i na izvorima ugljika koji nisu ugljikohidrati (tzv. glukogenim supstratima), kao što su octena i mliječna kiselina, piruvat, etanol i glicerol (1-3). Odavno je poznato da dodatak glukoze u kulturu kvasca dovodi do bitnih promjena u metabolizmu kvašćevih stanica, kao što su prestanak uporabe drugih izvora ugljika (4-8), te razgradnja šećera fermentativnim putem i u aerobnim uvjetima, tzv. Crabtreejev učinak (8-11). Slične pojave uočene su i u bakterijama te stanicama viših organizama (12-14). Istraživanja su pokazala da glukoza uzrokuje represiju sinteze određenih enzima pa je ova pojava nazvana *represija glukozom* ili *katabolička represija* (15-18). Osim *represije* glukoza izaziva i brzu *inaktivaciju* nekih enzima i trans-

Summary

The presence of glucose in the surrounding of the yeast cell blocks the consumption of other carbon sources within the cell. This phenomenon is a result of an action of the two regulatory mechanisms. The first mechanism, glucose or catabolite repression, acts on the level of the enzyme synthesis, so the glucose prevents transcription of the genes that are responsible for the metabolism of other carbon sources. The second mechanism, catabolite inactivation, leads to inactivation of enzymes already present within the cell if they are not needed or could be harmful for the cell.

Intensive research in recent years profoundly extended the knowledge about these two regulatory mechanisms indicating their exceptional complexity on the molecular level. Therefore, it is not surprising that some essential elements are still not fully understood.

portnih proteina, a to se naziva *katabolička inaktivacija* (19). U ovom se radu razmatraju regulacijski mehanizmi kojima se usklađuje količina aktivnih enzima u stanici, dok se drugi načini regulacije metabolizma, posebice oni na razini alosteričke kontrole aktivnosti enzima, mogu naći drugdje (20,21).

Osim temeljnog znanstvenog interesa, o kojem nije potrebno raspravljati jer se radi o evolucijski vrlo starim mehanizmima regulacije metabolizma, represija glukozom i katabolička inaktivacija kvasca *S. cerevisiae* imaju i praktično značenje. Naime, zahvati u regulaciji mikrobne stanice bilo genetičkim metodama ili putem signala iz okoline čine srž biotehnološke struke. Posebice se to odnosi na industrijske procese u kojima se iskorištava kvasac *S. cerevisiae*, gdje represija glukozom i katabolička inaktivacija

Kratice: cAMP, ciklički adenzin monofosfat;
2-DOG, 2-deoksi-D-glukoza.

utječu na tehnološki iznimno značajne pojave kao što su preferencija uporabe izvora ugljika u industrijskim hranjivim podlogama kompleksnog sastava (22) te na Crabtreejev učinak, pojavu s kojom se bore generacije tehnologa u proizvodnji pekarskog kvasca.

Represija glukozom – katabolička represija

Dodatkom glukoze u kulturu kvasca prestaje sinteza određenih proteina, odgovornih za metabolizam drugih izvora ugljika. Ova pojava naziva se *represija glukozom* (15–18). Kada se potroši glukoza u podlozi, nastaje obrnuti proces, tj. *derepresija* sinteze spomenutih proteina. Represija glukozom opći je regulacijski mehanizam u gotovo svih živih bića. Sinteza velikog broja proteina (preko 30) podložna je represiji glukozom, a mogu se svrstati u tri osnovne skupine (17,23).

- I) enzimi i proteini odgovorni za transport i metabolizam određenih ugljikohidrata poput maltoze, saharoze, galaktoze i škroba;
- II) enzimi glukoneogeneze i gliksilatnog ciklusa, tj. enzimi značajni za rast na glukogenim izvorima ugljika;
- III) neki enzimi Krebsovog ciklusa i respiracijskog lanca.

Represija sinteze navedene tri skupine enzima uzrokuje ove fiziološke pojave:

- I) prestaje metabolizam drugih šećera,
- II) prestaje metabolizam glukogenih supstrata, a
- III) pri višim koncentracijama glukoze metabolizam se odvija fermentativnim putem i u aerobnim uvjetima (tzv. Crabtreejev ili reverzni Pasteurov učinak).

Represija glukozom zapravo čini optimalnu strategiju kada se mikroorganizmi natječu za različite izvore hrane u okolišu. Glukoza je šećer koji koriste gotovo sve mikrobnе vrste pa je za nju kompeticija najveća. Stanica koja najprije troši samo glukozu, a druge izvore ugljika za koje je kompeticija manja ostavlja za poslije, imaće značajnu prednost u usporedbi s vrstama koje sve izvore ugljika koriste istodobno ili (još gore) obrnutim redoslijedom (16). Tako kvasci koji troše različite izvore ugljika uspostavljaju hijerarhiju u redoslijedu njihove uporabe, što najčešće prati opadajući intenzitet kompeticije za te izvore ugljika u prirodnom staništu. Kvasac *S. cerevisiae* izvore ugljika koristi ovim redoslijedom (2):

glukoza → drugi šećeri → glukogeni supstrati

Svaki član niza uzrokuje represiju sinteze enzima potrebnih za metabolizam članova niza koji se nalaze iza njega, a njegov metabolizam podložan je represiji supstratima u nizu ispred njega. Tako sintezu enzima iz treće skupine, osim glukoze, potiskuju i drugi šećeri. Već su Polakis i Bartley (8,9) upozorili da prilikom rasta kvasca na

galaktozi nastaje Crabtreejev učinak, tj. smanjuje se aktivnost enzima vezanih za iskorištavanje glukogenih supstrata kao što su malat sintaza, izocitrat liaza i malat dehidrogenaza. Crabtreejev je učinak također dio učinkovite strategije u borbi za opstanak u prirodnom staništu. Naime, pri velikim koncentracijama šećera, stanice kvasca i u aerobnim uvjetima koriste šećer energetski nepovoljnijim fermentativnim putem, ali pri tome vrlo brzo prevode šećer u etanol – glukogeni supstrat za koji je kompeticija kudikamo manja.

Represiju glukozom u bakterija *Escherichia coli* nazvao je Magasanik (12) *kataboličkom represijom* pretpostavivši da je neki od proizvoda katabolizma, a ne glukoza sama, neposredni inicijator represije sinteze određenih enzima. Dok je za enterobakterije ova pretpostavka i potvrđena, represija u stanicama kvasca još je uvijek nedovoljno objašnjena pa mnogi autori daju prednost nazivu *represija glukozom*. U daljnjem tekstu nazivi *represija glukozom* i *katabolička represija* koristit će se kao sinonimi.

Kod enterobakterija potpuno je dokazana uloga cikličkog AMP (cAMP) kao signalne supstancije za kataboličku represiju (24). Ovaj spoj reagira sa specifičnim proteinom (Cap protein) stvarajući cAMP-Cap kompleks, koji se veže na odgovarajuće mjesto na DNA i destabilizira dvostruku uzvojnici, omogućavajući tako vezanje RNA polimeraze (25). U prisutnosti glukoze niska je razina cAMP u stanici, pa nije moguća transkripcija gena koje kontrolira cAMP-Cap kompleks.

Dugo godina prevladavala je pretpostavka da sličan mehanizam djeluje i u stanicama kvasca pa je bilo više pokušaja da se represija glukozom stavi u odnos sa smanjenjem koncentracije cAMP u stanici (26). Međutim, istraživanja su pokazala da je razina cAMP u kvascu od 2 do 3 puta veća u prisutnosti glukoze (27). Istraživanja obavljena na mutantima *cyr1** koji nemaju funkcionalnu adenilat ciklazu, pa se cAMP mora dodavati u podlogu kao faktor rasta, potvrdila su da se dodatkom cAMP ne postiže oslobađanje od represije glukozom (28). Nadalje je utvrđeno da prisutnost glukoze u okolini aktivira adenilat ciklazu zbog čega se kratkotrajno povećava koncentracija cAMP u stanici u obliku karakterističnog udara. Slično povećanje koncentracije cAMP susreće se prilikom hormonalne regulacije metabolizma ugljikohidrata u stanicama viših eukariota. Taj udar u kvascu aktivira protein kinazu A koja zatim fosforilira mnoge proteine u stanici. Takozvana »fosforilacijska kaskada« proizvodi cijeli niz fizioloških učinaka, npr. stimulaciju sinteze i represiju razgradnje glikogena, kataboličku inaktivaciju fruktoza-bisfosfataze i izocitrat liaze, sudjeluje u regulaciji sporulacije i otpornosti na toplinski šok (29,30), a i u kataboličkoj inaktivaciji transportnih sustava za šećere (31). Sva ova opažanja potvrđuju da cAMP ima značajnu i složenu ulogu u metabolizmu kvasca, ali ne djeluje izravno u mehanizmu represije glukozom te je, prema tome, mehanizam represije glukozom u kvasca bitno različit od onog u *E. coli*.

* Mutacije, geni i proteini označeni su standardnom notacijom koja se primjenjuje u genetici kvasca: velikim slovima u kurzivu označeni su geni i dominantne mutacije u tim genima, malim slovima u kurzivu označene su recesivne mutacije, a standardnim slovima, pri čemu je prvo veliko, označeni su proteini, tj. proizvodi određenih gena. Npr. *fbp1* je recesivna mutacija u genu *FBP1* koji sadržava informaciju za enzim Fbp1 (fruktoza-1,6-bisfosfat 1-fosfatazu).

Osnovni se pristup u proučavanju represije kvasca glukozom temeljno na izolaciji mutanata kod kojih je poremećena katabolička represija. Izoliran je veliki broj mutanata i identificirani su mnogi geni uključeni u ovaj proces (15,16). Ti se mutanti mogu svrstati u dvije osnovne skupine:

1. *nerepresibilni mutanti* kod kojih se sinteza jednog ili više proteina ne reprimira glukozom (ovi mutanti u podlozi koja sadrži više različitih šećera usporedno troše glukozu i ostale šećere);
2. *ne-derepresibilni mutanti* koji su izgubili sposobnost derepresije (ovi mutanti ne mogu koristiti određene šećere jer su pod stalnom represijom bez obzira što glukoze nema u podlozi).

Proučavanja ove dvije skupine mutanata pokazala su da je represija glukozom osobito kompleksan regulacijski sustav te da u njemu sudjeluje više od deset regulacijskih gena (15,32).

Nerepresibilni mutanti kvasca

Jedna od najčešćih metoda za selekciju mutanata koji su izgubili sposobnost represije glukozom temelji se na primjeni toksičnih analoga šećera poput 2-deoksi-D-glukoze (2-DOG), D-glukozamina i drugih (15). 2-DOG se prenosi u stanicu pomoću transmembranskog prijenosnika za glukozu i zatim se fosforilira heksokinazama. Međutim, nastali spoj 2-deoksi-D-glukoza-6-fosfat nije dobar supstrat za sljedeći enzim glikolize – glukoz-6-fosfat izomerazu (33) pa je daljnja razgradnja ovog spoja neznatna (2). Osnovni je uzrok toksičnosti 2-DOG iscrpljivanje energetskih potencijala stanice, jer se ATP samo troši za fosforilaciju, a ne proizvodi u glikolizi. Osim toga, 2-DOG se nakon fosforilacije ugrađuje u trehalozu i glukane staničnog zida (34,35), što uzrokuje povećanu osjetljivost stanice na lizu.

Kao spoj vrlo sličan glukozu, 2-DOG izaziva kataboličku represiju, tj. u njezinoj prisutnosti stanica ne može koristiti druge šećere pa zbog toga inhibira rast kvasca na drugim izvorima ugljika. Mutanti koji steknu sposobnost rezistencije na 2-DOG (tj. da mogu rasti na drugim izvorima ugljika u prisutnosti 2-DOG), vrlo često tu sposobnost zahvaljuju činjenici da su izgubili svojstvo represije glukozom, dakle postali su *nerepresibilni mutanti*. Naime, nerepresibilni mutanti koriste glukozu pa tako i 2-DOG istodobno s drugim šećerima, pa je zbog uporabe alternativnog izvora ugljika negativni utjecaj 2-DOG na energetiku stanice kudikamo manji (15). Vrlo je jednostavna metoda selekcije ovih mutanata. Kvasac se nacijepi na podlogu koja sadrži represibilni izvor ugljika te 2-DOG u letalnoj koncentraciji. Izrasle su kolonije spontani mutanti rezistentni na 2-DOG. Frekvencija mutacija može se povećati primjenom mutagenih sredstava. Mutanti se zatim biokemijskim testovima provjeravaju da li su izgubili sposobnost represije glukozom. Naime, iako su većina rezistentnih mutanata zapravo nerepresibilni mutanti, postoje i druge mutacije kojima stanica postiže otpornost na 2-DOG. Tako su, naprimjer, dobro proučeni mutanti s povećanom aktivnosti fosfataze koja defosforilira 2-deoksi-D-glukoza-6-fosfat (36-38). Ovi mutanti, iako rezistentni na 2-DOG, i dalje imaju očuvan mehanizam represije glukozom.

Primjenom rezistencije na 2-DOG kao metodom selekcije izoliran je i karakteriziran veliki broj nerepresibilnih mutanata kvasca (39-43), što je bilo od velikog značaja za istraživanje fenomena represije glukozom. Prve mutante izolirali su Zimmermann i Scheel (39). U velikom broju mutanata, koji su pokazivali gubitak represije jednog ili više strukturalnih gena, uočene su promjene u aktivnosti enzima odgovornih za *fosforilaciju glukoze*. Jedna skupina mutanata, označena s *hex1*, imala je smanjenu fosforilacijsku aktivnost, a druga skupina, *hex2*, imala je povećanu fosforilacijsku aktivnost pri rastu na glukozu, ali ne i pri rastu na glukogenim supstratima (44). Mutaciju *hex2* karakterizirala je izrazita inhibicija rasta maltozom. Toksično djelovanje maltoze objašnjeno je nekontroliranim transportom maltoze i enormnim povećanjem intracelularne koncentracije glukoze (45). Treća skupina mutanata, nazvana *cat 80*, imala je normalnu fosforilacijsku aktivnost (46). Ubrzo se pokazalo da *hex1* mutanti nemaju heksokinazu PII (47,48) te da je ova mutacija u istom genu kao i mutacija *hxx2* u strukturalnom genu za heksokinazu PII koju su izolirali Lobo i Maitra (49). Ovi nalazi upućivali su na mogućnost da je heksokinaza PII zapravo *bifunkcijski protein* koji obavlja i enzimsku i regulacijsku funkciju. Ova pretpostavka potvrđena je kasnije izolacijom retro-mutanata *hex1^R* koji su povratili normalnu aktivnost heksokinaze PII, ali ne i sposobnost represije glukozom. Ovo je ujedno bila i potvrda da promjena brzine fosforilacije nije uzrok kataboličkoj represiji (kako su neki pretpostavljali), već posljedica mutacije gena za heksokinazu PII koja, osim fosforilacijske aktivnosti, obavlja i regulacijsku funkciju (50). Kada se mutant koji nema ni jednu od heksokinaza transformira plazmidom koji sadržava gen *HXX1* s informacijom za heksokinazu PI, dolazi do obnavljanja fosforilacijske aktivnosti, ali ne i sposobnosti represije glukozom (51). Transformacijom istog mutanta s plazmidom koji nosi gen *HXX2* s informacijom za heksokinazu PII uspostavljena je i represija glukozom (52). Time je bila u potpunosti potvrđena dvostruka uloga heksokinaze PII kao fosforilacijskog enzima i regulacijskog proteina potrebnog za represiju glukozom. Gen *HXX2* nosi informaciju za protein sastavljen od 484 aminokiseline, što ima relativnu molekulska masu od 53 600 (52). Gen ima veliku specifičnost kodona (82,5 %), ali kudikamo manju od gena za enzime glikolize gdje je specifičnost kodona najčešće oko 95 %. Biokemijska i fiziološka istraživanja heksokinaze PII pokazala su da ovaj enzim djeluje i kao *protein kinaza* čija aktivnost ovisi o koncentraciji glukoze u okolici i intracelularnoj koncentraciji cAMP (53). Također je utvrđeno da heksokinaza PII podliježe *autofosforilaciji* (54) te da se prilikom derepresije ne provodi proteoliza heksokinaze PII (55). Novija istraživanja sve više potvrđuju da je heksokinaza PII jedan od ključnih regulacijskih proteina i da djeluje kao »okidač« *represije glukozom*. C-terminalni kraj molekule enzima odgovoran je za regulacijsku funkciju (17). Sintaza heksokinaze PII pod kontrolom je gena *HEX2* i *CAT80*. Mutacije u ovim genima uzrokuju izostanak represije glukozom i povećavaju aktivnost heksokinaze PII, koja je kod *hex2* mutanata udvostručena, a kod *cat80* mutanata je veća za 40 % (17). Nedavno je kloniran i gen *HEX2* (56). Ovaj gen nosi informaciju za protein relativne molekulske mase od 62 833 s izrazito velikim udjelom serina (15,7 %).

Tablica 1. Pregled nerepresibilnih mutacija (15,16)
Table 1. Review of non-repressible mutations (15,16)

Mutacija Mutation	Enzimi pod utjecajem mutacije Enzymes affected by mutation				
	maltaza maltase	invertaza invertase	citokromi cytrocromes	izocitrat liaza isocitrate lyase	galaktokinaza galactokinase
<i>hex1 = glr1 = hxk2</i>	+	+	+/-	-	+
<i>hex2</i>	+	+	+/-	-	nt
<i>cat80</i>	+	+	nt	-	nt
<i>cyc8 = ssn6</i>	+	+	+	+	nt
<i>cyc9 = flk1 = tup1</i>	+	+	+	+	nt
<i>grr1</i>	+	+	+/-	nt	+
<i>reg1</i>	-	+	nt	nt	+
<i>CCR80</i>	nt	+/-	nt	+/-	nt
<i>CCR91</i>	-	nt	+	nt	nt

(+) ima utjecaja na ekspresiju gena (gubitak represije)

(+) affected gene expression (loss of repression)

(-) nema utjecaja na ekspresiju gena (represija normalna)

(-) no effect on gene expression (repression normal)

(+/-) djelomičan utjecaj

(+/-) partial effect

(nt) nije testirano

(nt) not tested

Osim tri spomenute mutacije (*hex1*, *hex2* i *cat80*) izoliran je još priličan broj ne-represibilnih mutacija, ali mnoge od njih nisu dobro proučene ni fiziološki ni genetički. Mnoge od njih su istovrsne već opisanim mutacijama, samo su im drugi autori dali druga imena. Vrijedan je bio trud Juane Gancedo (15,16) da sistematizira nalaze mnogih laboratorija koji se bave ovom problematikom, a rezultat je pregled ne-represibilnih mutanata prikazan u tablici 1. Većina mutanata u tablici 1 pokazuje *pleiotropni učinak*, tj. mutacija djeluje na veliki broj enzima u stanici. Osim ovih, izolirani su i mutanti kod kojih je represije oslobođen samo jedan enzim ili biokemijski put. Tako je naprimjer kod dominantnog *ADR3* mutanta izoenzim alkohol dehidrogenaza II oslobođena kataboličke represije, kod recesivnog *cgr1* mutanta oslobođena je katalaza T, a kod dominantnih mutanata *GAL 82* i *GAL 83* galaktokinaza, a vjerojatno su i ostali enzimi za metabolizam galaktoze oslobođeni kataboličke represije (16). Od mutacija s pleiotrofnim učinkom (tablica 1), *hex1* (*hxk2*), *hex2* i *cat 80* utječu na ekspresiju maltaze i invertaze, utjecaj na citokrome je promjenljiv, a ne utječu na izocitrat liazu. Slično djelovanje ima i mutacija *grr1*. Mutante u genu *GRR1* izolirali su Bailey i Woodward (57) na temelju sposobnosti rasta na galaktozi u prisutnosti 2-DOG. Nedavno je kloniran gen *GRR1* (58). Gen sadržava informaciju za protein relativne molekulske mase od 135 000 koji se sintetizira konstitutivno u malim količinama. Proteinski lanac sadržava 12 ponovljenih sekvencija bogatih leucinom, karakterističnih za proteine koji ulaze u interakcije s drugim proteinima. Pokusi lokalizacije ovog proteina u stanici pomoću specifičnih antitijela pokazali su da se *Grr1* protein nalazi u citoplazmi, ali ne u frakciji topljivih citoplazminih proteina. Budući da je imunološka detekcija proteina bila moguća tek nakon denaturacije ureom, a mutanti pokazuju i morfološku promjenu (»kobasičasti« oblik stanica i pupova), autori pretpostavljaju da je *Grr1* protein u stanici vezan na subcelularni matriks. Delecijska (null) mutacija pokazuje još neke neobične značajke kao, naprimjer, osjetljivost na prototrofiju aromatskim aminokiselinama te pro-

mjenu u regulaciji *SUC2* gena (jednog od strukturnih gena za invertazu) koji mutacijom prelazi iz glukoza-represibilnog u glukoza-inducibilni oblik (58).

Mutacija *reg1* razlikuje se od dosada spomenutih po tome što ne utječe na maltazu, a na kromosomskoj mapi nalazi se vrlo blizu *hex2* (59). Ovdje treba spomenuti da *reg1* mutacija, kao i *grr1* i *hex1*, djeluju i na galaktokinazu (15). Kod ostalih mutanata, nažalost, nije istražen utjecaj mutacije na enzime metabolizma galaktoze. Pretpostavlja se da mutacije *cyc8* i *cyc9* imaju širi spektar djelovanja nego što je to prikazano u tablici 1 (60). Posljednja dva mutanta u tablici 1 razlikuju se od ostalih jer se ovdje radi o *dominantnim* mutacijama. Međusobno se razlikuju po tome što *CCR80* ne može rasti na glukozi, dok *CCR91* može. Do danas nije otkrivena mutacija koja oslobađa od represije *sve* represibilne enzime, što pokazuje da ne postoji *vrhovni* gen za kataboličku represiju već da se tu najvjerojatnije radi o nekoliko nezavisnih regulacijskih sustava (15,16).

Ne-derepresibilni mutanti kvasca

Ne-derepresibilni mutanti pokazuju učinak represije i kad glukoze nema u okolici, tj. kod njih je represija nekih enzima izražena *konstitutivno*. Najčešće se izoliraju prema nesposobnosti rasta na glicerolu ili maltozi (61), odnosno saharozi (62), te kao retromutanti ne-represibilnih mutanata (63). Također se mogu izolirati iz mutanata koji sadržavaju samo glukogenu alkohol dehidrogenazu što je pod kontrolom kataboličke represije (*AdhII*). Ako se ovi mutanti podvrgnu djelovanju mutagena, dobiju se sojevi koji stvaraju vrlo male kolonije na podlozi koja sadrži etanol i 0,4 % glukoze. Ove kolonije rastu slabo jer ne mogu deprimirati alkohol dehidrogenazu nakon što potroše glukozu u podlozi (64). Navedenim metodama izolirano je više ne-derepresibilnih mutanata koji pokazuju pleiotropne defekte pri rastu na različitim izvorima ugljika, jer je sinteza potrebnih enzima pod represijom (tablica 2).

Mutanti u genima *CAT1* i *CAT3* ne mogu rasti na maltozi i glukogenim supstratima (61,65). Tzv. *snf* mutacije

(od *sucrose non-fermenting*), redom od *snf1* do *snf6* fiziološki su karakterizirane kao gubitak sposobnosti fermentacije saharoze zbog pogreške u derepresiji invertaze. Naknadno je utvrđeno da gen *SNF3* sadržava informaciju za jednu od komponenti sustava za transport glukoze i fruktoze (66,67). Nadalje, mutanti *snf1*, *snf2*, *snf4* i *snf5* ne mogu rasti na maltozi, galaktozi i glicerolu (62,68). Do sada su bolje karakterizirane mutacije *snf1* i *snf4*, za koje se pouzdano zna da nisu u istom genu. Mutacija *snf1* je u istom genu kao i *cat1* te *ccr1*. Alelizam ovih mutacija utvrđen je testovima komplementacije i usporedbom restriksijskih mapa kloniranih gena (26,63). Daljnjom biokemijskom karakterizacijom utvrđeno je da *SNF1* gen sadržava informaciju za ATP-ovisnu protein kinazu (69). Nedavno je kloniran gen *CAT3* koji sadržava informaciju za protein relativne molekulske mase od 36 400 (71). Frakcioniranjem stanica utvrđeno je da je protein *Cat3* lokaliziran u jezgri (71), za razliku od protein kinaze *Snf1* (*Cat1*) koja je jednoliko razdijeljena po stanici (69). Mutacija *snf4*, pored invertaze, blokira derepresiju enzima potrebnih za rast na glicerolu i galaktozi (16). Mutanti *snf2* i *snf5* imaju znatno smanjenu derepresiju invertaze i vrlo malu razinu aktivnosti ovog enzima, što pokazuje da su ova dva gena potrebna za punu derepresiju (70). Skupina mutacija *ccr* (64) onemogućava derepresiju alkohol dehidrogenaze *AdhII*. Mutanti *ccr2*, *ccr3* i *ccr4* također pokazuju pleiotropni učinak i međusobno su slični, pri čemu *ccr2* i *ccr3* nisu aleli istog gena, dok bi *ccr4* mogao biti alel jednog od ova dva gena. Mutante *hap2* i *hap3* karakterizira nesposobnost derepresije gena za sintezu citokroma (72). Pretpostavlja se da oba imaju pleiotropni učinak, ali utjecaj mutacija na druge enzime još nije istražen (16).

Katabolička inaktivacija

Pored *represije* sinteze mnogih enzima, dodatak glukoze u podlogu uzrokuje i brzu *inaktivaciju* nekih enzima i transportnih proteina. Naime, *represija* samo blokira *de novo* sintezu određenog proteina, koji se zatim »razrjeđuje« rastom i razmnožavanjem stanica. Međutim, na neke promjene u okolici stanica mora odgovoriti iznimno brzo i tada je potrebno *inaktivirati* postojeći enzim čija bi reakcija u novonastalim uvjetima mogla biti štetna. Ovu su pojavu prvi opazili Spiegelman i Reiner (4) koji izvještavaju o brzom nestajanju aktivnosti »galaktozimaze« nakon dodatka glukoze u kulturu kvasca koja je rasla na galaktozi. S vremenom su otkriveni novi enzimi podložni brzom inaktivaciji nakon dodatka glukoze u podlogu, kao naprimjer malat dehidrogenaza (73), fruktoza-bisfosfataza (74) i fosfoenolpiruvat karboksikinaza (75). Ovu je pojavu nazvao Holzer (19) *katabolička inaktivacija*.

Najbolje je istražena katabolička inaktivacija enzima glukoneogeneze fruktoza-bisfosfataze, točnije fruktoza-1,6-bisfosfat 1-fosfataze (*Fbp1*). Prilikom rasta na glukogenom supstratu (poput etanola, acetata, piruvata i sl.) aktivnost ovog enzima je iznimno velika (20,21). Pojavom glukoze u okolici stanice prekida se glukoneogeneza i metabolički put se preusmjerava u glikolizu. Pri tome je prijeko potrebna vrlo brza inaktivacija *Fbp1*, jer bi istodobno djelovanje ovog enzima i fosfofruktokinaze dovelo do energetskog »kratkog spoja« što bi bilo kobno za stanicu. Inaktivacija *Fbp1* odvija se u dvije faze: u prvoj koja traje do tri minute od dodatka glukoze izgubi se oko 60 % po-

Tablica 2. Pregled ne-derepresibilnih mutacija (15,16)
Table 2. Review of non-derepressible mutations (15,16)

Mutacija Mutation	Enzimi pod utjecajem mutacije Enzymes affected by mutation			
	maltaza maltase	invertaza invertase	citokromi cytochromes	izocitrat liaza isocitrate lyase
<i>cat1 = ccr1 = snf1</i>	+	+	-	+
<i>cat3</i>	+	-	-	+
<i>ccr2</i>	-	nt	+/-	+
<i>ccr3</i>	-	nt	+/-	+
<i>ccr4</i>	nt	nt	nt	+/-
<i>snf4</i>	nt	+	nt	nt
<i>hap2</i>	nt	nt	+	nt
<i>hap3</i>	nt	nt	+	nt

(+) ima utjecaja na ekspresiju gena (gubitak derepresije)
(+) affected gene expression (loss of derepression)
(-) nema utjecaja na ekspresiju gena (derepresija normalna)
(-) no effect on gene expression (derepression normal)
(+/-) djelomičan utjecaj
(+/-) partial effect
(nt) nije testirano
(nt) not tested

četne aktivnosti, a u drugoj se ostatak aktivnosti izgubi gotovo u potpunosti za otprilike 60 minuta (76,77). Reaktivacija nakon produljene inaktivacije u potpunosti se inhibira cikloheksimidom što pokazuje da je u ovom slučaju potrebna sinteza proteina *de novo* (74). Nasuprot tome, ako inaktivacija traje do 3 minute, reaktivacija je neosjetljiva na cikloheksimid (76). Nadalje, pokusi sa specifičnim antitijelima pokazali su da iako aktivnost enzima već nakon nekoliko minuta opadne oko 60 %, količina se specifičnog antigenog materijala praktički ne mijenja u prvih 30 minuta, nakon čega smanjenje antigenog materijala teče gotovo usporedno s padom aktivnosti (77). Ova opažanja upućivala su na pretpostavku da u prvoj fazi kataboličke inaktivacije dolazi do reverzibilne kovalentne modifikacije, koja uzrokuje djelomičnu inaktivaciju i vjerojatno »označava« molekulu enzima za proteolizu što se odvija tijekom druge faze. Kemizam ove kovalentne modifikacije određen je praćenjem ugradnje radioaktivnog fosfora u specifični antigeni materijal. Utvrđeno je da se ovdje radi o fosforilaciji serinskih ostataka u molekuli *Fbp1* (78-80). Prva faza inaktivacije zahtijeva prisutnost adenilat ciklaze što upućuje na to da u fosforilaciji sudjeluje i cAMP kao efektor (81). Osim fosforilacije, smanjenju aktivnosti *Fbp1* u prvoj fazi doprinosi i alosterička inhibicija fruktoza-2,6-bisfosfatom (20,21).

Pored ključnih enzima glukogeneze i glioksilatnog ciklusa, potrebnih za rast na glukogenim supstratima, kataboličkoj inaktivaciji podložni su i transportni proteini koji prenose određene šećere u stanicu. Tako dodatak glukoze u podlogu, koja sadržava neki drugi šećer, dovodi do brze inaktivacije transportnog sustava za taj šećer. Na taj se način gotovo trenutačno sprečava iskorištavanje drugih šećera u prisutnosti glukoze. Katabolička inaktivacija dokazana je za transport galaktoze (82) i maltoze (5,83). Zanimljivo je da se pritom ne inaktiviraju i enzimi potrebni za metabolizam ovih šećera. Ovi su enzimi pod kontrolom *represije* glukozom i gube se »razrjeđivanjem« zbog rasta

i razmnožavanja stanica. Dodatkom glukoze u podlogu s *maltozom* dolazi do gotovo potpune inaktivacije transportnog sustava za maltozu tijekom 90 minuta (5,6). Ponovnim prebacivanjem stanica u podlogu koja sadržava samo maltozu, dolazi do brze regeneracije transportnog sustava za maltozu (za otprilike jedan sat). Regeneracija transportnog sustava za maltozu, nakon prenošenja stanica u uvjete koji dovode do derepresije, zahtijeva sintezu proteina *de novo* (5,83). Dodatak glukoze u kulturu stanica koje rastu na *galaktozi* također uzrokuje brzu i ireverzibilnu, ali ne i potpunu inaktivaciju transportnog sustava za galaktozu (82). Uklanjanjem glukoze, transportni se sustav za galaktozu potpuno reaktivira za otprilike 3 sata, za što je potrebna sinteza proteina *de novo*. Nedavno je utvrđeno da se katabolička inaktivacija transporta galaktoze odvija fosforilacijom proteina pomoću cAMP ovisne protein kinaze (31) pa je, po svemu sudeći, katabolička inaktivacija transportnih proteina za različite šećere samo jedna od posljedica »fosforilacijske kaskade« koja započinje aktivacijom protein kinaze A (29-31).

Do kataboličke inaktivacije transportnih sustava dolazi i pri inhibiciji sinteze proteina, bilo dodatkom inhibitora bilo iscrpljivanjem podloge na izvoru dušika (84,85). Nasuprot tome, većina enzima u stanici *S. cerevisiae* vrlo su stabilni i njihova se aktivnost u različitim uvjetima ne mijenja dulje vrijeme (85,86). Sustavi za transport glukoze i maltoze brzo se inaktiviraju u navedenim uvjetima. Za inaktivaciju je potrebna aktivnost glikolize, tako da do inaktivacije neće doći ako se glikoliza spriječi na jedan od navedenih načina: a) ako u mediju nema izvora ugljika; b) ako se izvor ugljika zamijeni nefermentabilnim supstratom poput 2-DOG; c) ako je izvor ugljika glukogeni supstrat poput etanola; d) ako se u podlogu s fermentabilnim supstratom dodaju inhibitori glikolize poput jodoacetata ili arsenata (83,85,87). I transportni sustav za galaktozu brzo se inaktivira inhibicijom sinteze proteina (88). Inaktivacija se odvija kinetikom reakcije prvoga reda a očituje se u smanjenju broja transportnih proteina po stanici te gubitku afiniteta prema galaktozi. Vrijeme poluživota proteina za transport galaktoze u ovim uvjetima iznosi oko 1,3 sata. Inaktivacija zahtijeva prisutnost energetskog supstrata. Za razliku od transportnih sustava za glukozu i maltozu, do inaktivacije sustava za transport galaktoze dolazi, iako u manjoj mjeri, i kada se fermentabilni supstrat zamijeni glukogenim supstratom poput etanola (88). I ova se inaktivacija po svemu sudeći odvija »fosforilacijskom kaskadom« (29-31).

Zaključak

Represija glukozom i katabolička inaktivacija dva su regulacijska mehanizma koji određuju redoslijed kojim kvasac *S. cerevisiae* troši različite izvore ugljika. Veliki broj mutanata s poremećenom represijom ili derepresijom pokazao je da je represija glukozom iznimno složen regulacijski sustav te da u njemu sudjeluje više od deset regulacijskih gena (15,32). Složenost ovog regulacijskog sustava razumljiva je ako se ima u vidu da cjelokupni sustav zahtijeva senzorne i signalne mehanizme za otkrivanje glukoze u okolici te regulacijske proteine za mnoštvo različitih strukturnih gena koji su pod kontrolom represije glukozom. Nadalje, do danas još nije otkrivena mutacija koja oslobađa sve represibilne enzime od represije, što svjedoči

da ne postoji *vrhovni* gen za kataboličku represiju već da se tu najvjerojatnije radi o nekoliko nezavisnih regulacijskih sustava (15-17). Katabolička inaktivacija također je složen mehanizam koji se aktivira »fosforilacijskom kaskadom« što započinje aktivacijom protein kinaze A (29-31). Ovaj se enzim aktivira »udarom« cAMP kao prijenosnikom signala koji »dojavljuje« prisutnost glukoze u okolici stanice. Nažalost, mnogi elementi u oba mehanizma još su nepoznati.

Extended Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is well known for its ability to use various carbon sources (1-3). The presence of glucose in the surrounding of the yeast cell will block the consumption of other carbon sources within the cell. This phenomenon is a result of an action of the two regulatory mechanisms. The first mechanism, *glucose or catabolite repression*, acts on the level of the enzyme synthesis, so the glucose prevents transcription of the genes that are responsible for the metabolism of other carbon sources (4-18). The second mechanism, *catabolite inactivation*, leads to inactivation of enzymes already present within the cell if they are not needed or could be harmful for the cell (19).

Glucose repression is a global regulatory mechanism common to almost every heterotrophic species. Intensive research has detected more than 30 yeast enzymes that are subject to glucose repression (4-11,15-17,23). Studies of the molecular mechanism of glucose repression in yeast (26-28) proved that it differs to a great extent from that proposed for enterobacteria (12,24,25). The main tool for studying the glucose repression was the isolation of two classes of repression mutants: *the non-repressible mutants* (Table 1) in which some of the repressible functions are released from glucose repression, and *the non-derepressible mutants* (Table 2) which are not able to derepress some of the repressible functions even when glucose is not present in the environment of the cell (15,16). Non-repressible mutants were mainly isolated as colonies that are resistant to 2-deoxy-D-glucose or some other non-metabolizable glucose analogue (2,15,16, 33-43). A number of genes have been detected which are involved in the repression mechanism (Table 1). One of the most important is the *HEX1*. This gene was found to be allelic to the *HXX2* gene which codes the hexokinase isoenzyme PII (39,47-52). Thus the hexokinase PII was proven to be the bifunctional protein which carries the catalytic and regulatory functions. It can act as a protein kinase (53), and could be subjected to autophosphorylation (54). The C-terminal end of the hexokinase PII molecule is responsible for the regulatory function (17). The level of the hexokinase PII is regulated by the action of the genes *HEX2* and *CAT80*. Mutations in these genes produce derepressed mutants with increased hexokinase PII activity (17). The gene *GRR1* codes the protein that is bound to subcellular matrix (57,58). Mutation *reg1* maps close to the *hex2* (59) but allelism between the two is obscure. The mutations *cyc8* and *cyc9* seem to act on a broader scale than shown in Table 1 (60), and a peculiarity of the *CCR80* and *CCR91* mutations is that they are of a dominant type (15, 16). *The non-derepressible mutants* were usually selected by the criterion of inability to grow on maltose or glucogenic substrates (61,64), sucrose and rafi-

nose (62), or as revertants of non-repressible mutants (63). The most significant are *cat1* and *cat3* (61,65), and a class of *snf* mutants (62,65-70). The *snf1* mutation is allelic with *cat1* and *ccr1* (26,63). The *SNF1* gene codes the ATP-dependent protein kinase which is uniformly distributed in the yeast cell (69). The gene *CAT3* codes the regulatory protein which is localized in the nucleus (71). Characterization of other mutations presented in the Table 2 are still in progress.

The catabolite inactivation is a regulatory mechanism named by Holzer (19) who defined it as inactivation of the enzymes and other proteins present in the cell when they are not needed or could be harmful. Key enzymes of gluconeogenesis and glyoxylate cycle such as malate dehydrogenase (73), fructose-1,6-bisphosphatase (74), phosphoenolpyruvate carboxykinase (75), as well as some sugar transporters (5,82,83) are subject to catabolite inactivation. Studies on fructose-1,6-bisphosphatase (74,76-80) proved that inactivation proceeds in two phases. In the first phase, which lasts about 3 minutes, reversible loss of 60 % of initial activity occurs. In this phase two parallel processes take place: i) a synthesis and accumulation of the fructose-2,6-bisphosphate which acts as an inhibitor of the fructose-1,6-bisphosphatase (20,21); and ii) a phosphorylation of the serine residues of the enzyme (78-80) by an action of the cAMP-dependent protein kinase (81). So in the first phase allosteric control and a covalent modification of the enzyme occur simultaneously. In the second phase residual activity is lost in 60-90 minutes, and reactivation requires a *de novo* protein synthesis (74,76,77) indicating that the phosphorylated enzyme becomes a target of a proteolytic attack.

Sugar transporters of yeast are also subject to catabolite repression when glucose is added into the medium. In that way the yeast cell almost immediately stops the uptake of other sugars when glucose is present in the environment. The full inactivation of the maltose transporters in about 90 minutes was reported (5,6), and the reactivation required a *de novo* protein synthesis (5,83). Similar observations were reported for inactivation of the galactose transport (82), for which a protein phosphorylation by means of the cAMP-dependent protein kinase was suggested as a molecular mechanism (31). Thus there is growing body of evidence that catabolite inactivation of many sugar transporters and cytosolic enzymes is a result of the so called »phosphorylation cascade« triggered by the cAMP pulse which activates one or more protein kinases in the yeast cell (29-31).

Intensive research in recent years profoundly extended the knowledge about the glucose repression and catabolite inactivation bringing the picture of exceptional complexity of these two mechanisms on the molecular level. Therefore, it is not surprising that some important elements are still not well understood.

Abbreviations:

cAMP, cyclic adenosine monophosphate;
2-DOG, 2-deoxy-D-glucose.

Mutations, genes, and proteins are designated by standard notation from yeast genetics: recessive mutations are written in italics, genes and dominant mutations in

italic capitals, and protein gene products in normal letters (first one in capitals). Eg. *fbp1* is a recessive mutation of the gene *FBP1* which codes the enzyme Fbp1 (fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphatase).

Literatura

1. N.J.W. Kreger-van Rij: »The Yeasts, a Taxonomic Study«, Elsevier, Amsterdam (1984).
2. J. A. Barnett, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32 (1976) 125.
3. D. G. Fraenkel: Carbohydrate metabolism. In »The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: The Metabolism and Gene Expression«, J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982) pp. 1-37.
4. S. Spiegelman, J. M. Reiner, *J. Gen. Physiol.* 31 (1947) 175.
5. C. P. M. Görtz, *Biochim. Biophys. Acta*, 184 (1969) 299.
6. R. A. de Kroon, V. V. Koningsberger, *Biochim. Biophys. Acta*, 204 (1970) 590.
7. B. G. Adams, *J. Bacteriol.* 111 (1972) 308.
8. E. S. Polakis, W. Bartley, *Biochem. J.* 97 (1965) 284.
9. E. S. Polakis, W. Bartley, *Biochem. J.* 97 (1965) 298.
10. M. Lemoigne, J.-P. Aubert, J. Millet, *Ann. Inst. Pasteur*, 87 (1954) 427.
11. R. H. De Deken, *J. Gen. Microbiol.* 44 (1966) 149.
12. B. Magasanik, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26 (1962) 249.
13. H. G. Crabtree, *Biochem. J.* 23 (1929) 536.
14. O. Warburg: »Ueber den Stoffwechsell der Tumoren«, Springer, Berlin (1926).
15. J. M. Gancedo, C. Gancedo, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (1986) 179.
16. J. M. Gancedo: Approaches to the study of catabolite repression in yeast. In »Proceedings of the Alko Symposium on Industrial Yeast Genetics, Helsinki 1987«, M. Korhola, H. Nevalainen (Eds.), Foundation for Biotechnological and Industrial Fermentation Research, Helsinki (1987) pp. 59-73.
17. K. D. Entian, M. Rose, W. Albig, H. J. Schüller, D. Niederacher, H. R. Graack, S. Hassler, G. Dussling: Analysis of genes involved in glucose repression and derepression in *Saccharomyces cerevisiae*. In »Proceedings of the Alko Symposium on Industrial Yeast Genetics, Helsinki 1987«, M. Korhola, H. Nevalainen (Eds.), Foundation for Biotechnological and Industrial Fermentation Research, Helsinki (1987) pp. 75-89.
18. K. D. Entian, H. J. Schüller, D. Niederacher, M. Rose, W. Albig, H. P. Hauser: Regulation of sugar metabolism and glucose repression in yeast. In »14 th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, Helsinki, 7-13 August, 1988. Book of Abstracts«, M. L. Suikko, J. Knowles (Eds.), *Yeast* 4 (1988) S10.
19. H. Holzer, *Trends Biochem. Sci.* 1 (1976) 178.
20. H.G. Hers, E. Van Schaftingen, *Biochem. J.* 206 (1982) 1.
21. B. Hess, A. Boiteux, D. Kuschmitz: Regulation of glycolysis. In »34. Colloquium – Mosbach 1983, Biological Oxydations«, Springer-Verlag, Berlin (1983) pp.249-266.
22. T. D'Amore, S. Novak, I. Russell, G. G. Stewart, *EBC-Microbiology Subgroup Bulletin, Copenhagen, Denmark* (1990) 145.
23. H. J. Schüller, K.-D. Entian, *Mol. Gen. Genet.* 209 (1987) 366.
24. J. L. Botsford, *Microbiol. Rev.* 45 (1981) 620.
25. I. Pastan, R. Perlman, *Science*, 169 (1969) 339.
26. H. R. Mahler, P. K. Jaynes, J. P. McDonough, D. K., Hanson, *Curr. Top. Cell. Reg.* 18 (1981) 455.
27. P. Erasó, J. M. Gancedo, *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 195.
28. K. Matsumoto, I. Uno, Y. Oshima, T. Ishikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2355.
29. C. Wills, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 25 (1990) 245.

30. J. M. Theveleinen, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 1301.
31. J. Ramos, V. P. Cirillo, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 3545.
32. M. Carlson, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 4873.
33. P. K. Maitra, Z. Lobo, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 475.
34. P. Biely, S. Bauer, *Biochim. Biophys. Acta*, 156 (1968) 432.
35. Z. Kratky, P. Biely, S. Bauer, *Eur. J. Biochem.* 54 (1975) 459.
36. C. F. Heredia, A. Sols, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 224.
37. M. Martin, C. F. Heredia, *FEBS Lett.* 83 (1977) 245.
38. M. F. Heredia, C. F. Heredia, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2870.
39. F. K. Zimmermann, I. Scheel, *Mol. Gen. Genet.* 154 (1977) 75.
40. Z. Lobo, P. K. Maitra, *Mol. Gen. Genet.* 157 (1977) 297.
41. K.-D. Entian, F. K. Zimmermann, *Mol. Gen. Genet.* 177 (1980) 345.
42. R. M. Jones, I. Russell, G. G. Stewart, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44 (1986) 161.
43. I. Russell, Studies on Yeast with Improved Carbohydrate Utilization, Ph.D. Thesis, University of Strathclyde, Glasgow (1988).
44. K.-D. Entian, *Mol. Gen. Genet.* 186 (1981) 278.
45. K.-D. Entian, *Mol. Gen. Genet.* 179 (1980) 169.
46. K.-D. Entian, F. K. Zimmermann, I. Scheel, *Mol. Gen. Genet.* 156 (1977) 99.
47. K.-D. Entian, *Mol. Gen. Genet.* 178 (1980) 633.
48. K.-D. Entian, D. Mecke, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 870.
49. Z. Lobo, P. K. Maitra, *Arch. Biochem. Biophys.* 182 (1977) 639.
50. K.-D. Entian, K.-U. Frölich, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 29.
51. K.-D. Entian, E. Kopetzki, K.-U. Frölich, D. Mecke, *Mol. Gen. Genet.* 98 (1984) 50.
52. K.-U. Frölich, K.-D. Entian, D. Mecke, *Gene*, 36 (1985) 105.
53. P. Herrero, R. Fernandez, F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 1209.
54. R. Fernandez, P. Herrero, E. Fernandez, M. T. Fernandez, Y. S. Lopez-Boado, F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.* 134 (1988) 2493.
55. T. Fernandez, P. Herrero, Y. S. Lopez-Boado, R. Fernandez, F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 2509.
56. D. Niederacher, K.-D. Entian, *Mol. Gen. Genet.* 206 (1987) 505.
57. R. B. Bailey, A. Woodward, *Mol. Gen. Genet.* 193 (1984) 507.
58. J. S. Flick, M. Johnston, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 5101.
59. K.-D. Entian, *Microbiol. Sci.* 3 (1986) 366.
60. R. J. Trumbly, *J. Bacteriol.* 166 (1986) 1123.
61. F. K. Zimmermann, I. Kaufmann, H. Rasenberg, P. Haussmann, *Mol. Gen. Genet.* 151 (1977) 95.
62. M. Carlson, B. C. Osmond, D. Botstein, *Genetics*, 98 (1981) 25.
63. C. L. Denis, *Genetics*, 108 (1984) 833.
64. M. Ciriacy, *Mol. Gen. Genet.* 154 (1977) 213.
65. K.-D. Entian, F. K. Zimmermann, *J. Bacteriol.* 151 (1982) 1123.
66. L. Neigeborn, P. Schwartzberg, R. Reid, M. Carlson, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 3569.
67. L. F. Bisson, L. Neigeborn, M. Carlson, D. G. Fraenkel, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 1656.
68. L. Neigeborn, M. Carlson, *Genetics*, 108 (1984) 845.
69. J. L. Celenza, M. Carlson, *Science*, 233 (1986) 1175.
70. E. Abrams, L. Neigeborn, M. Carlson, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 3643.
71. H. J. Schüller, K.-D. Entian, *Gene*, 67 (1988) 247.
72. J. L. Pinkham, J. T. Olesen, L. P. Guarente, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 578.
73. J. Ferguson, M. Boll, H. Holzer, *Eur. J. Biochem.* 1 (1967) 21.
74. C. Gancedo, *J. Bacteriol.* 107 (1971) 401.
75. S. Haarasilta, E. Oura, *Eur. J. Biochem.* 52 (1975) 1.
76. A. G. Lenz, H. Holzer, *FEBS Lett.* 109 (1980) 271.
77. H. Holzer: Mechanism and function of reversible phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. In »Molecular Aspects of Cellular Regulation 3«, P. Cohen (Ed.), Elsevier, Amsterdam (1984) pp.143-154.
78. M. J. Mazón, J. M. Gancedo, C. Gancedo: Inactivation and turnover of fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. In »Metabolic Interconversion of Enzymes 1980«, H. Holzer (Ed.), Springer-Verlag, Berlin (1981) pp. 168-173.
79. M. J. Mazón, J. M. Gancedo, C. Gancedo, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1128.
80. D. Müller, H. Holzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103 (1981) 926.
81. P. Tortora, N. Burlini, F. Leoni, A. Guerritore, *FEBS Lett.* 155 (1983) 39.
82. H. Matern, H. Holzer, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 6399.
83. A. Busturia, R. Lagunas, *Biochim. Biophys. Acta*, 820 (1985) 324.
84. A. Alonso, A. Kotyk, *Folia Microbiol.* 23 (1978) 118.
85. R. Lagunas, C. Dominguez, A. Busturia, M. J. Saez, *J. Bacteriol.* 152 (1982) 19.
86. H. Halvorson, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 255.
87. A. Busturia, R. Lagunas, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 379.
88. C. DeJuan, R. Lagunas, *FEBS Lett.* 207 (1986) 258.