

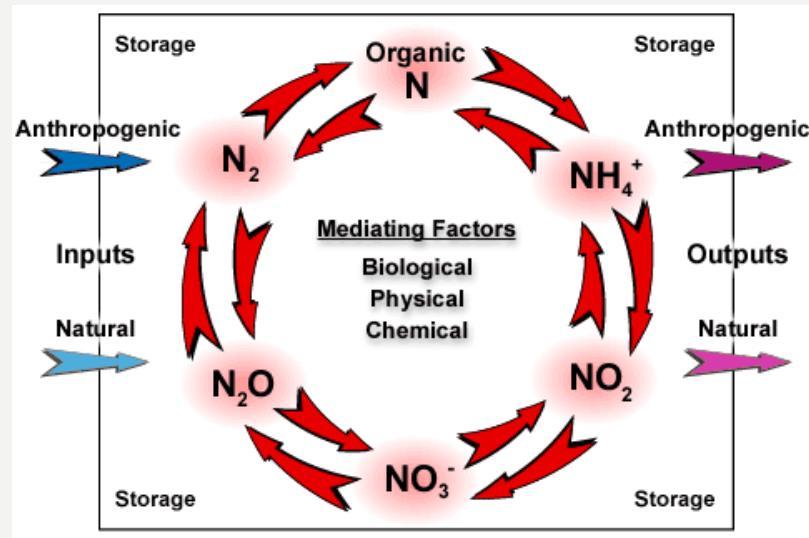
# **NH<sub>4</sub><sup>+</sup> TOXICITY IN YEAST**

- Nitrogen is essential
- Important inorganic N forms
- Ammonium toxicity
- Ammonium transportes
- Advantages of working with yeasts

# NITROGEN AS NUTRIENT

Nitrogen is essential for many biological processes; and is crucial for any life here on Earth.

Earth's atmosphere is about 78%  $N_2$ , making it the largest pool of nitrogen.



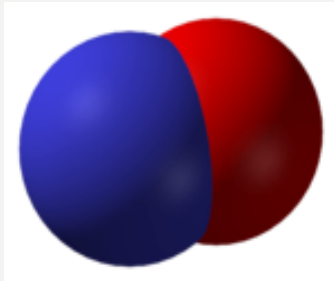
[www.sws.uiuc.edu/nitro/biggraph.asp](http://www.sws.uiuc.edu/nitro/biggraph.asp)

Control of systemic pH by the kidney

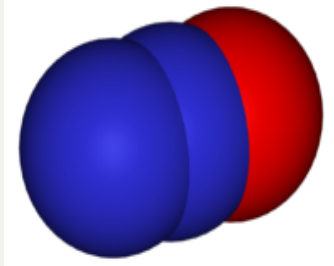
N is present in many chemical forms (compounds or "species"), both organic and inorganic, in the atmosphere, biosphere, hydrosphere, and geosphere. It occurs in the gas, liquid (dissolved in water), and solid phases.

Limits plant growth and production

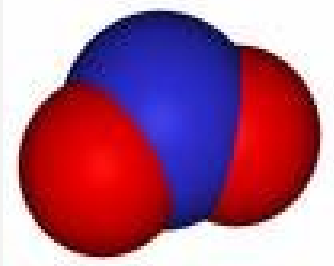
# IMPORTANT INORGANIC N FORMS



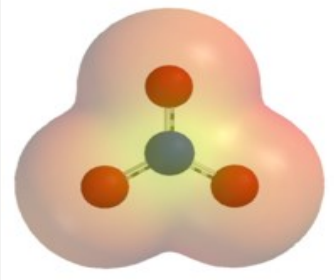
NO



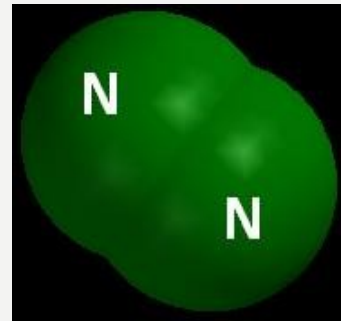
N<sub>2</sub>O



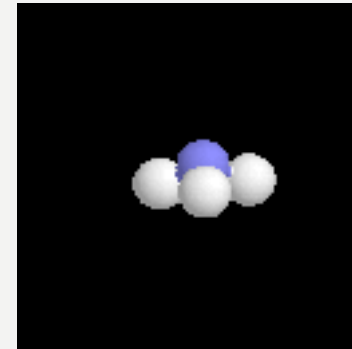
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



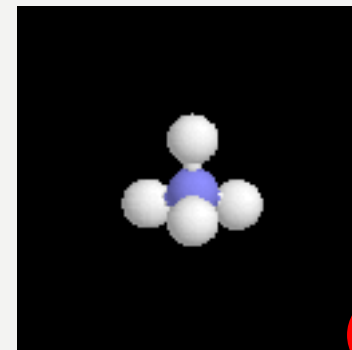
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



N<sub>2</sub>



NH<sub>3</sub>



NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

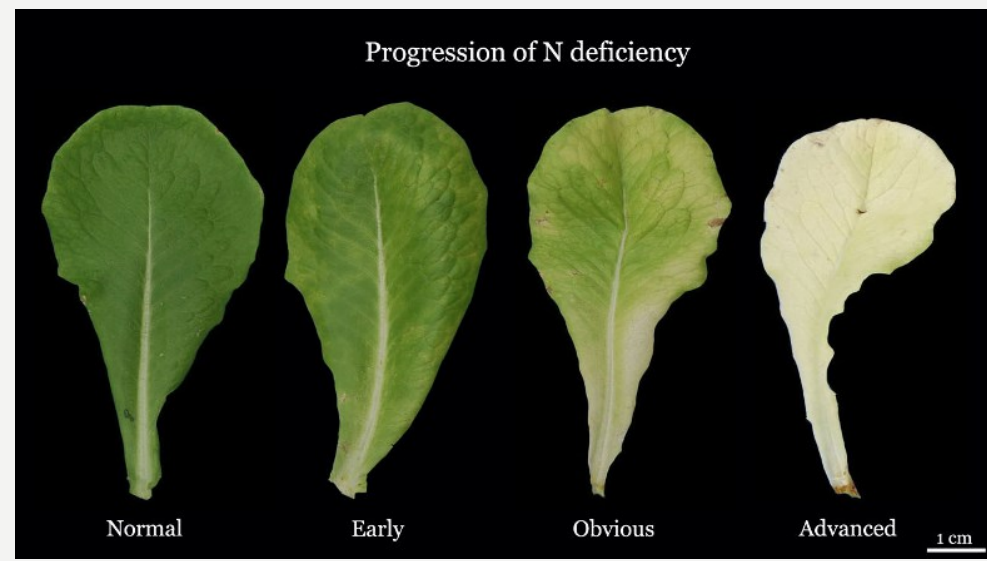
Diazotrophs - NH<sub>3</sub> - nitrogenase enzyme.



Important inorganic species include N<sub>2</sub>, nitric acid (HNO<sub>3</sub>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), nitric oxide (NO), N dioxide (NO<sub>2</sub>), **ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**, and **ammonia (NH<sub>3</sub>)**.

# AMMONIUM TOXICITY

- Altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  causam toxicidade em:
- Plantas;
- Morte de peixes;
- Eutrofização de ambientes aquáticos;
- Em ruminantes causa coordenação motora, tremores musculares, colapso e morte.





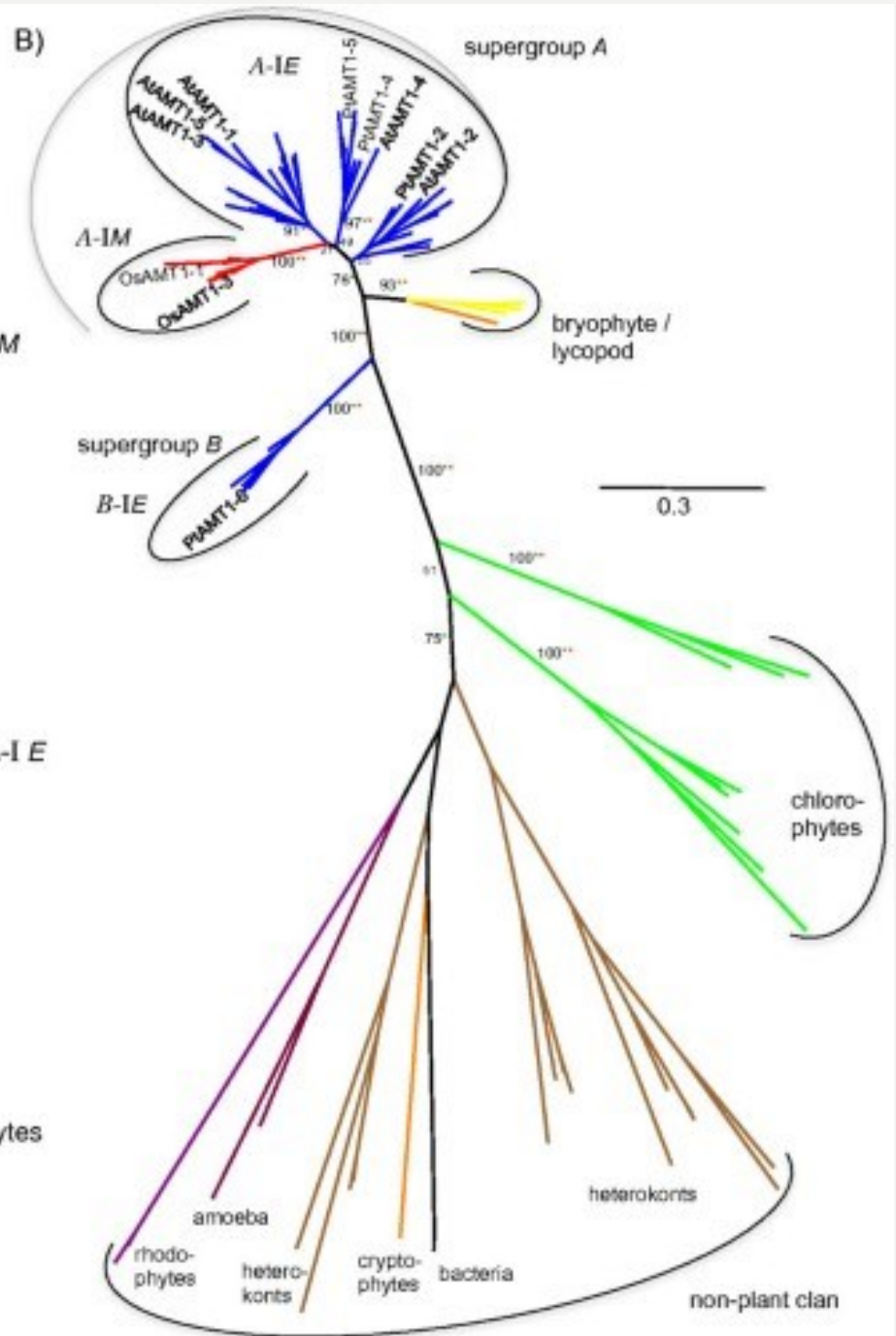
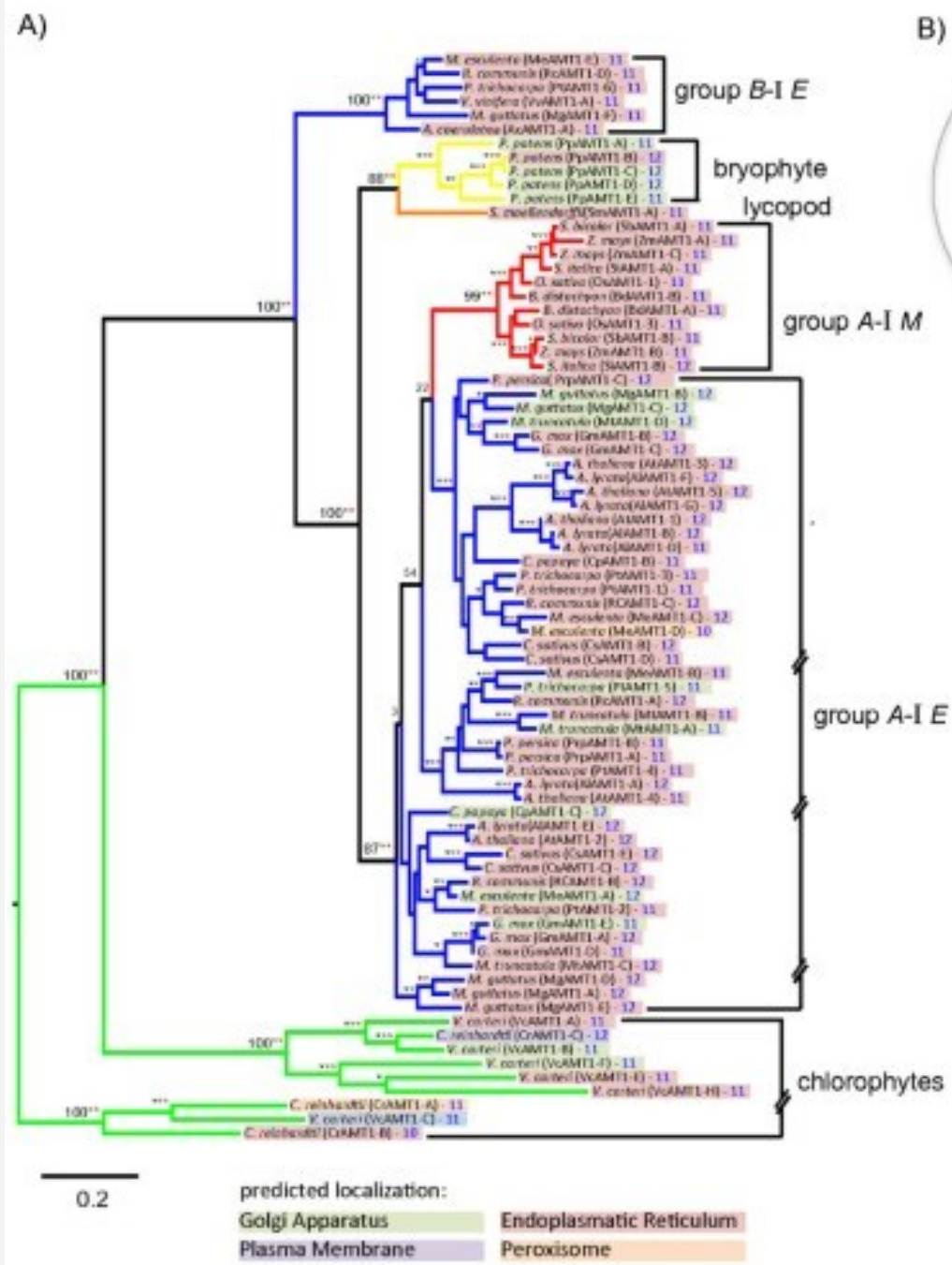


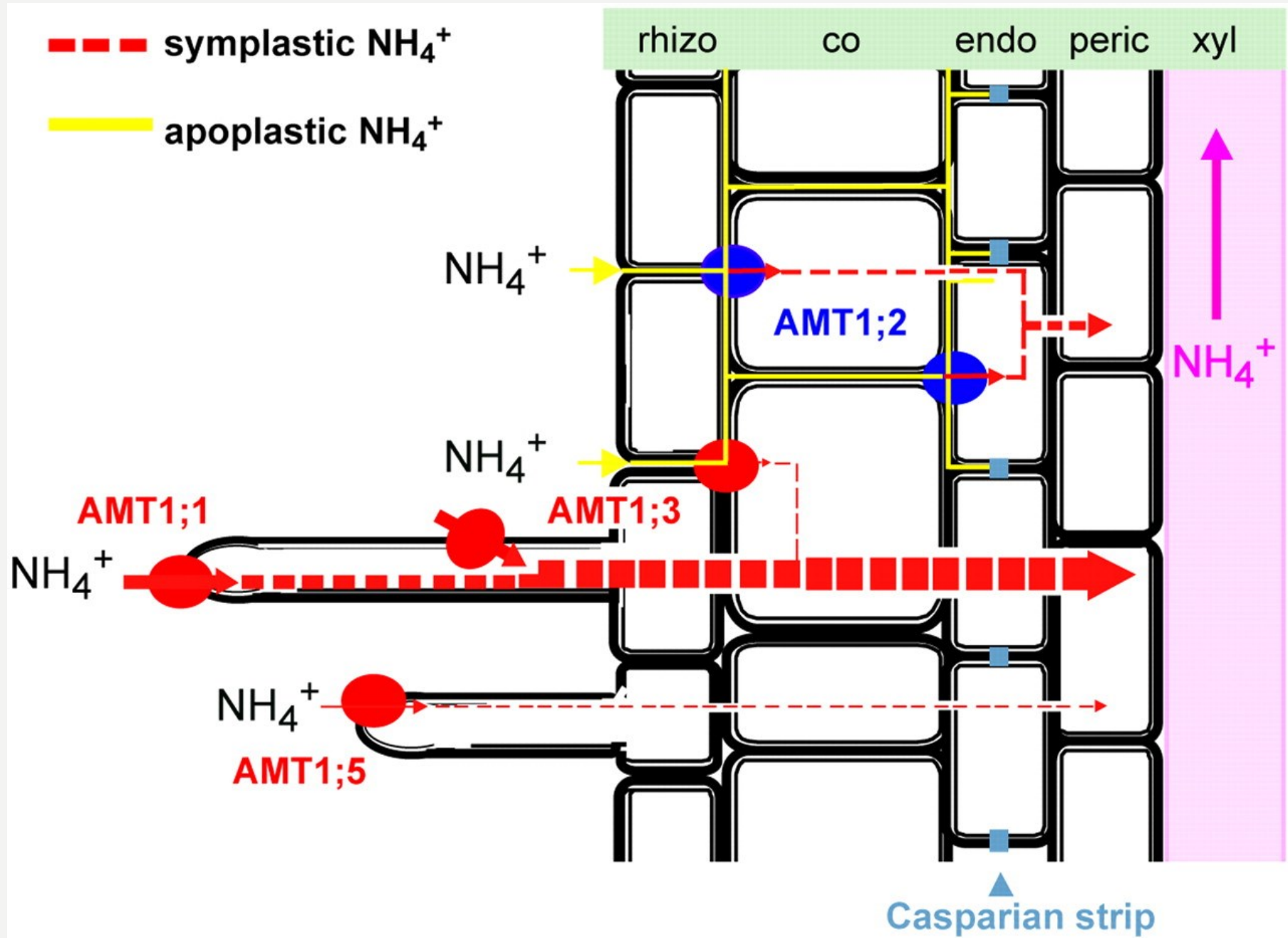
**And in microorganisms ??**

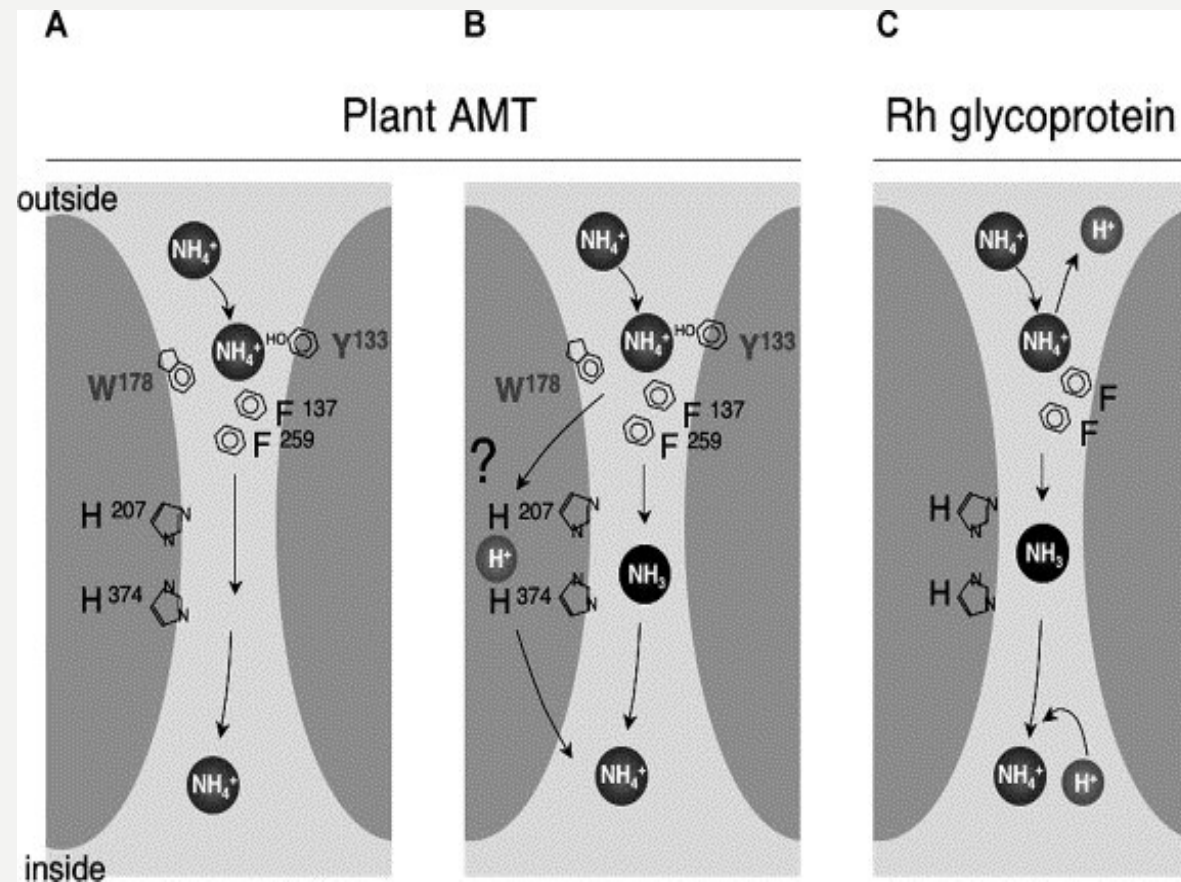
# AMMONIUM TRANSPORTS

- Transporters belonging to an ammonium transporter protein superfamily
  - Superfamily is divided into two main subfamilies :
  - Transportadores de Amônio (AMT) bacteria, fungi, plants
  - Methylammonium/ ammonium Permeases (Meps) - Yeast
  - rhesus (Rh) animals erythrocyte, kidney and liver cells for detoxification purposes and to maintain pH homeostasis
  - NSCC
  - Aquaporin
- remove ammonium for assimilation







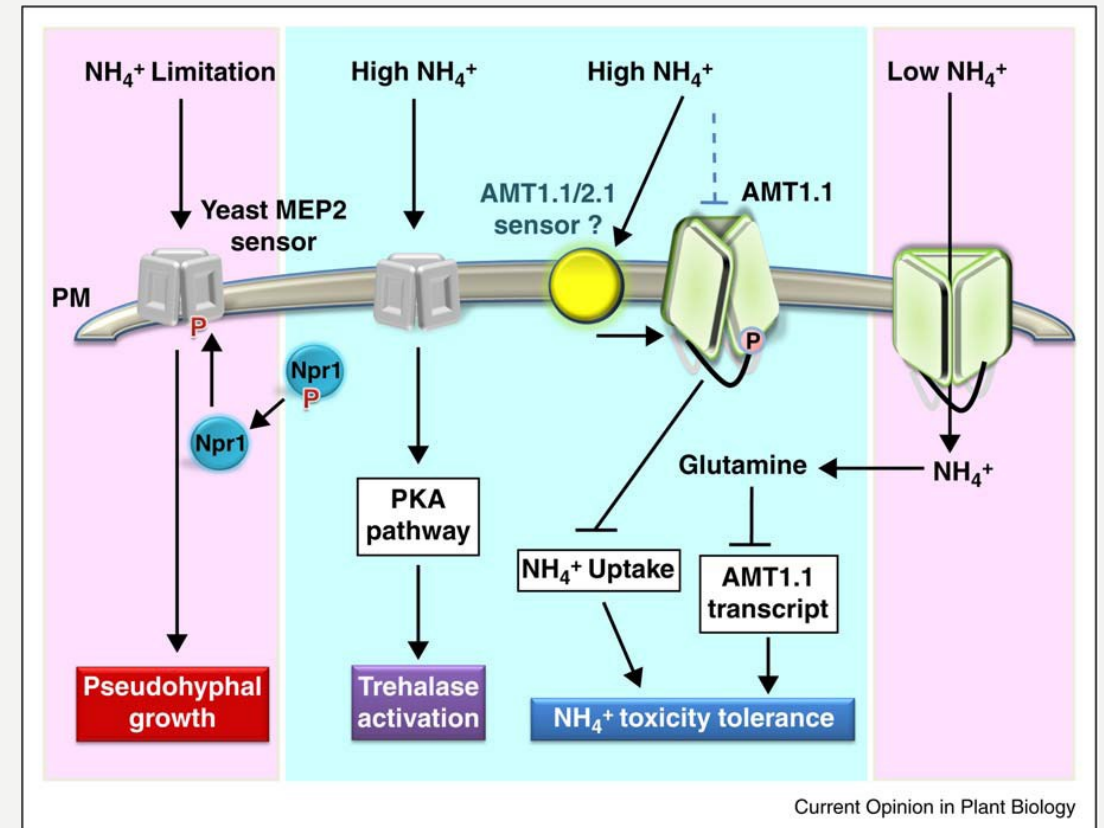


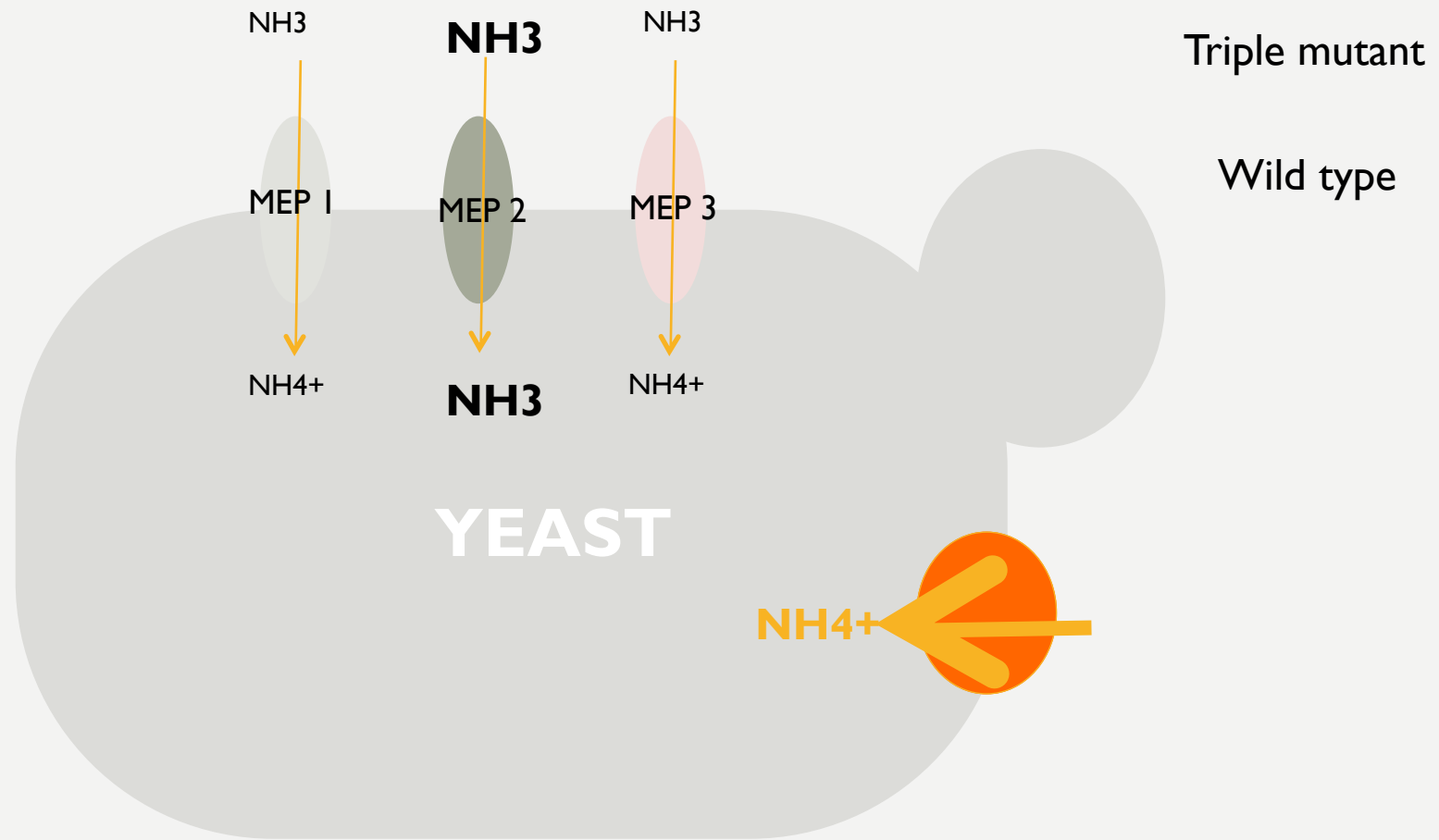
Schematic diagram of the proposed transport mechanisms in plant AMTs (A or B) and in eukaryotic Rh glycoproteins (C). The functional data from plant AMTs are in accordance with models A and B.  $\text{NH}_4^+$  recruitment at the external pore mouth by residues including tryptophan (W178) and tyrosine (Y133, numbering as in LeAMT1;1). **Model A:** Minor conformational changes open the pathway and allow  $\text{NH}_4^+$  to pass the two histidines and release  $\text{NH}_4^+$  on the inside. **Model B:** After  $\text{NH}_4^+$  recruitment and stripping off a  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_3$  passes through the hydrophobic pore. Each  $\text{NH}_3$  associates after passage with  $\text{H}^+$  that has been channeled through an unidentified pathway. The transport in Rh glycoprotein may involve  $\text{NH}_3$  conduction and a non-aromatic  $\text{NH}_4^+$  recruitment site (**Model C**).

# AMMONIUM TRANSPORTS

- High Affinity Transport System (HATS)
  - concentrations up to 0.5-1 mM N

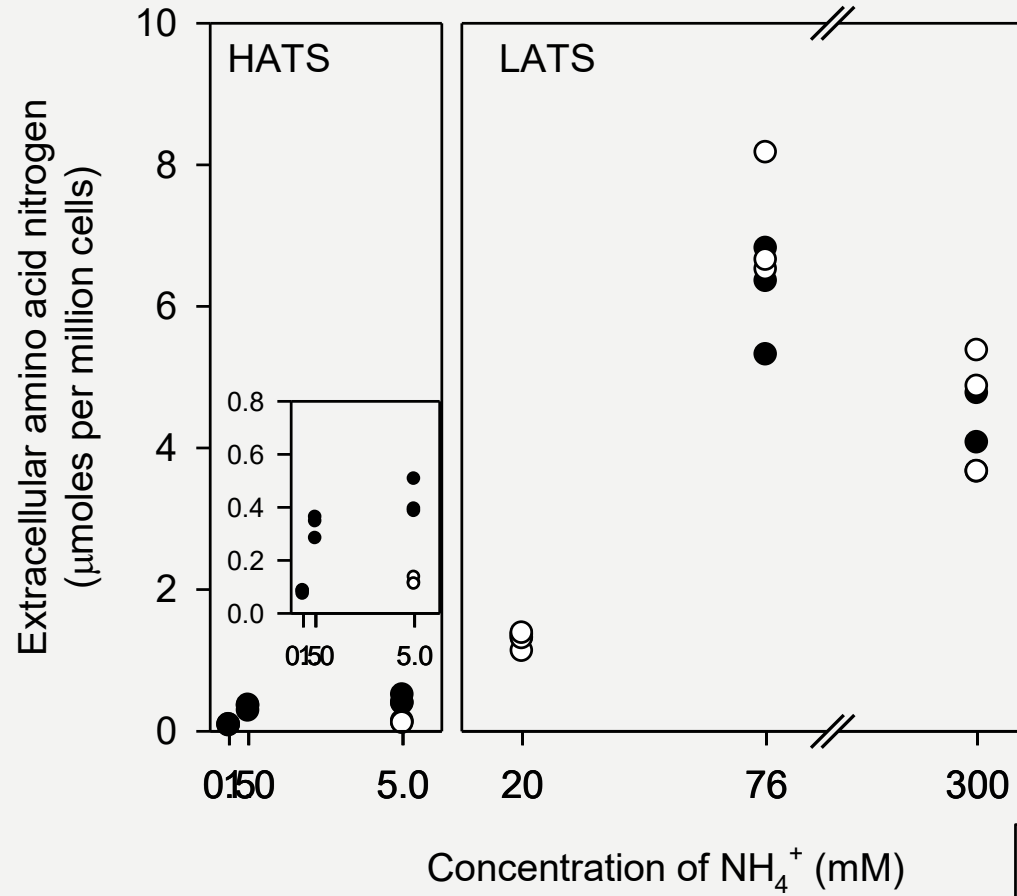
- Low Affinity Transport System (LATS)
  - N concentrations above 0.5-1 mM



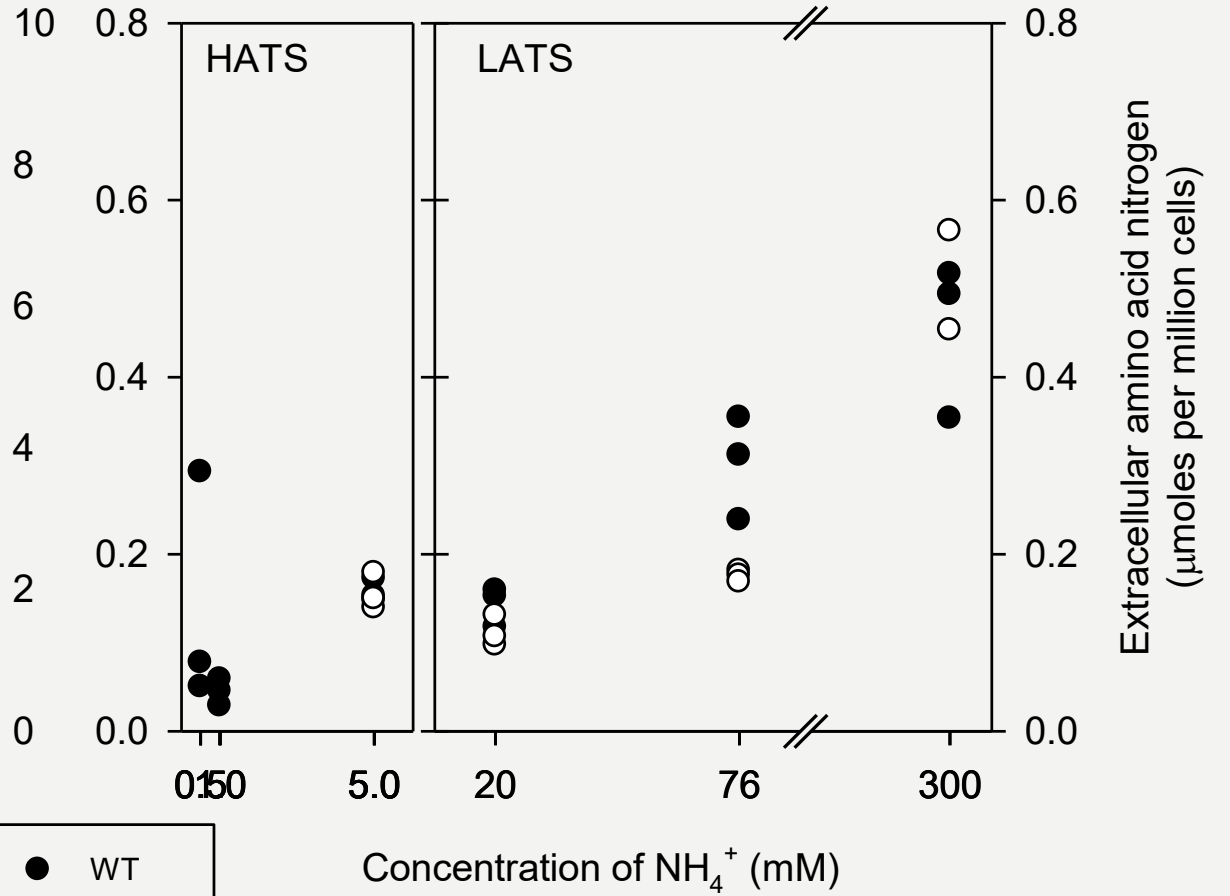


MEP 2  
Repressed at  $[NH_4^+] > 5 \text{ mM}$

### Low Potassium (1.3 mM)

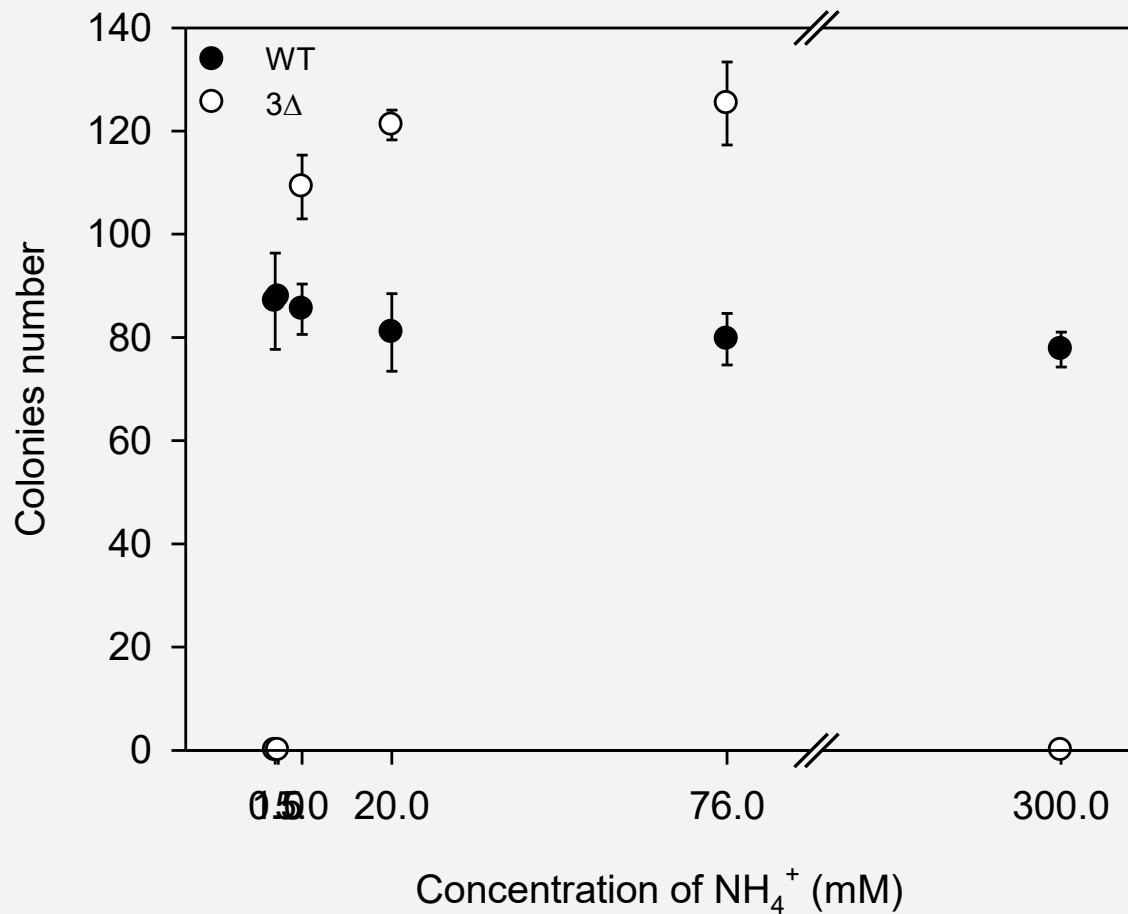


### High Potassium (13 mM)

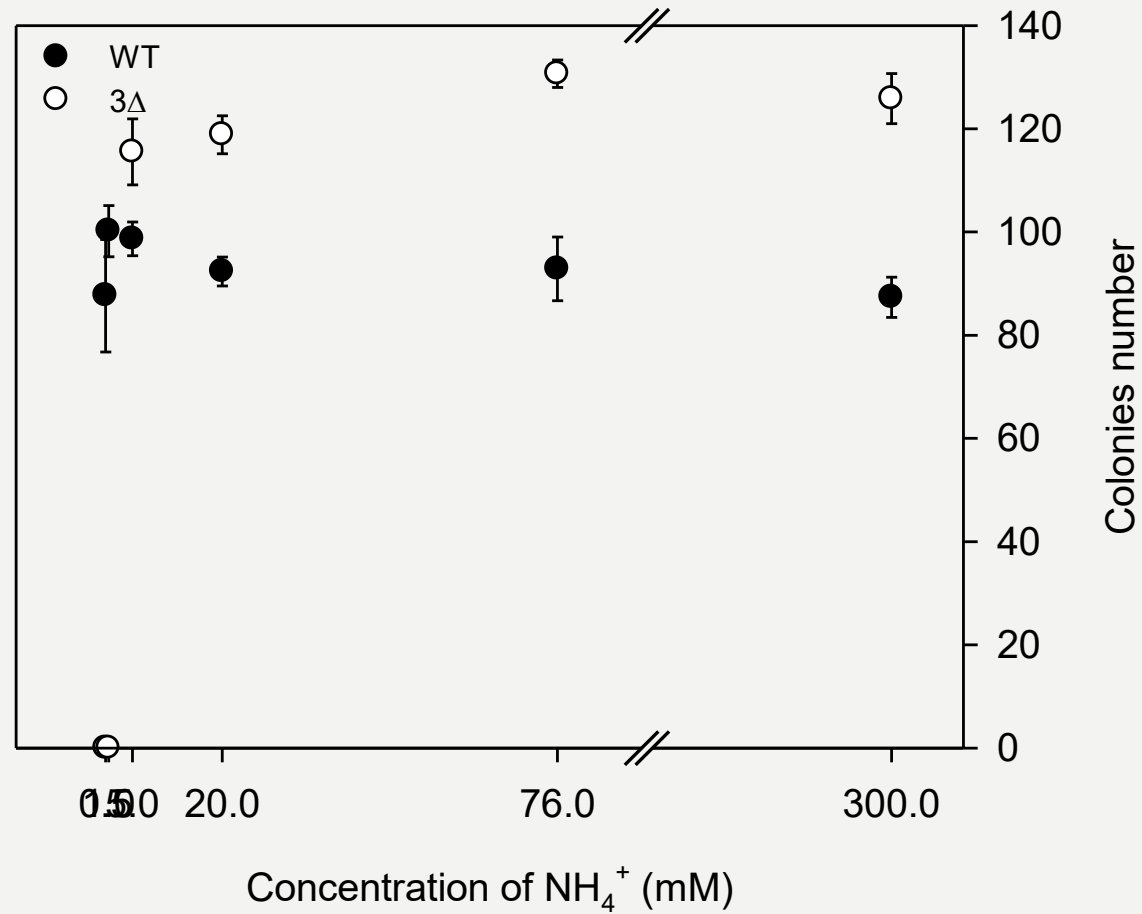


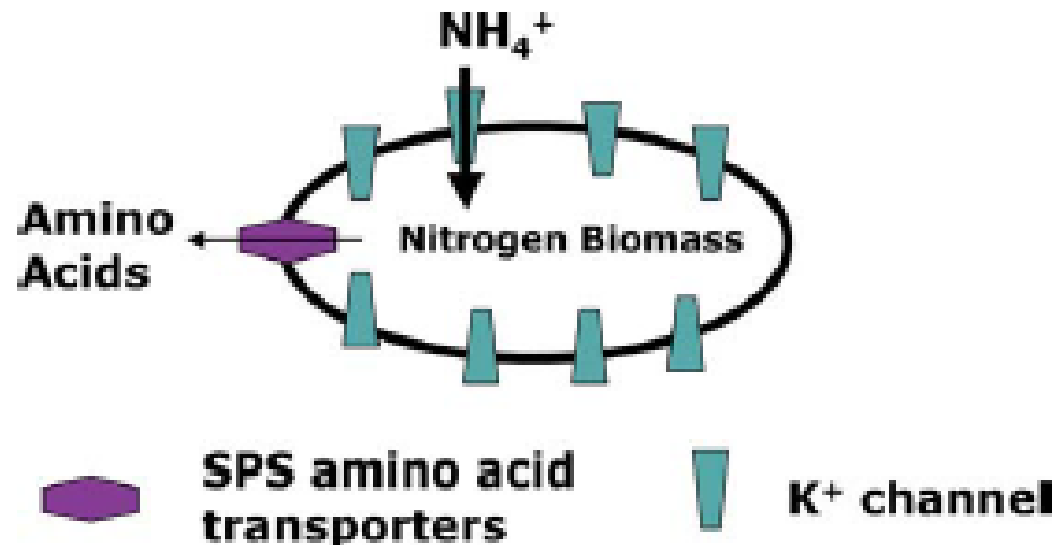


Low Potassium (1.3 mM)



High Potassium (13 mM)

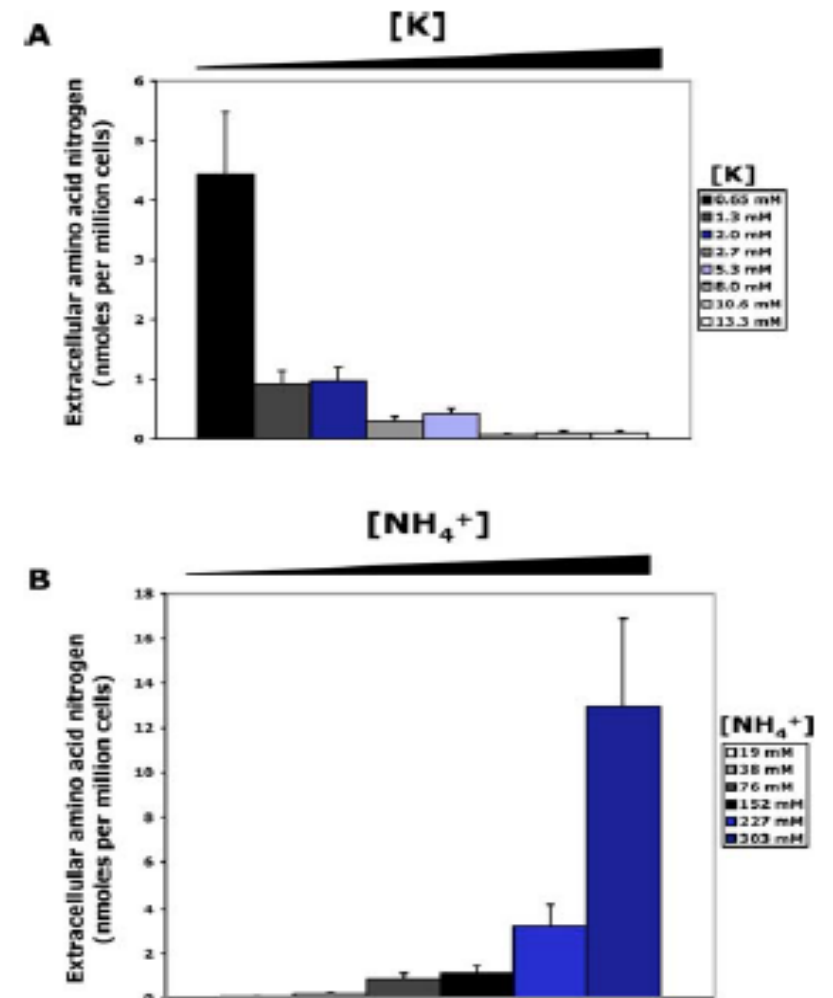




**Figure 10.** Model for Ammonium Toxicity and Detoxification in Yeast

We believe the results of this paper support the following model. If ammonium is present in high concentrations in the environment, then ammonium ions can enter the cell unregulated via potassium channels. Although most of the ammonium can be taken up into new biomass (if excess carbon and other nutrients are available), the unregulated flux creates an excess of internal ammonium that becomes toxic. To reduce internal ammonium levels, amino acids are excreted (most likely through the SPS amino acid transporters). The nitrogen affixed to amino acids will not be taken up through the potassium channels and is thus detoxified with respect to the cell.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040351.g010



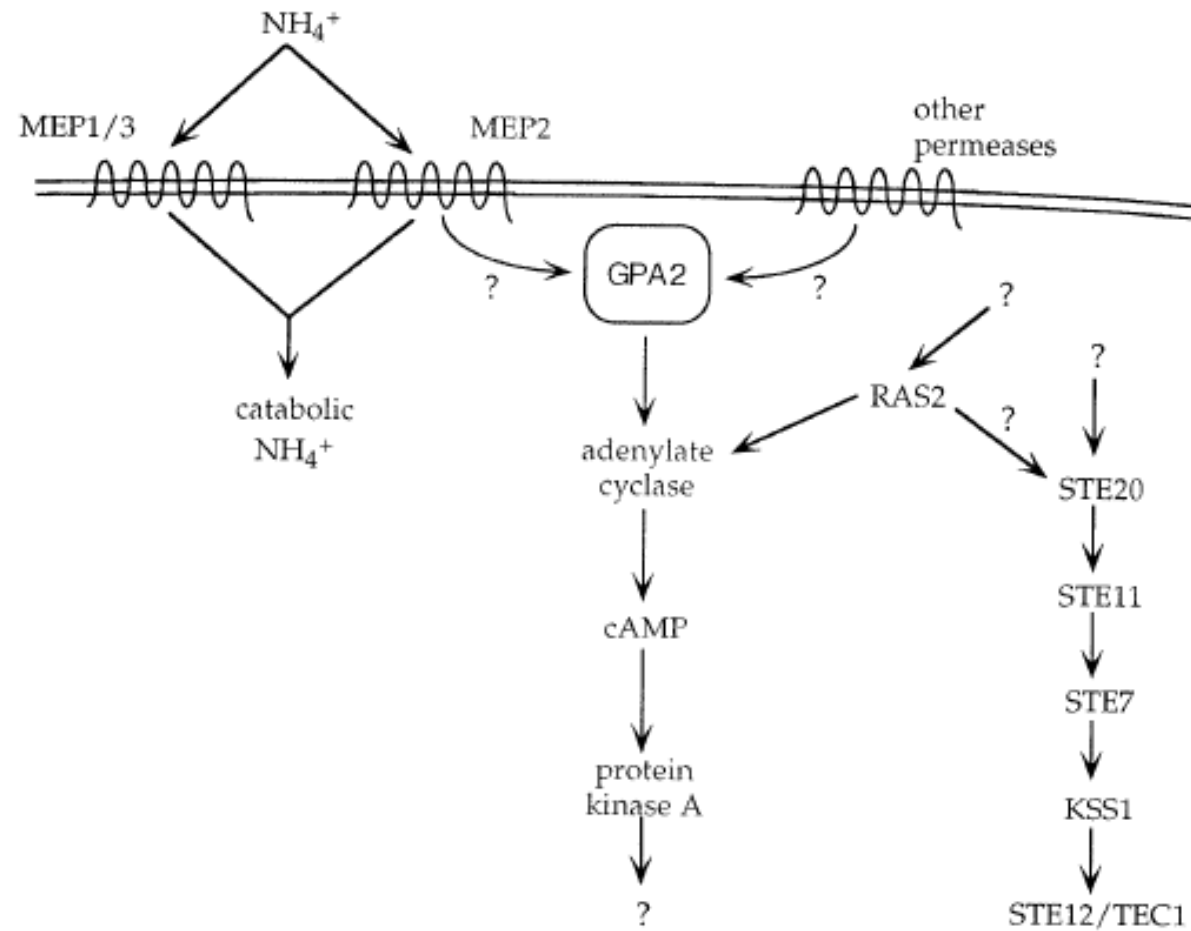
**Figure 5.** Ammonium Toxicity Induces Amino Acid Excretion

LC-MS/MS was used to analyze filtrates from steady-state chemostats. The detected amino acids were expressed in nmoles based on standards (Materials and Methods). The detected amino acids were scaled for number of excreted nitrogen molecules per amino acid (i.e., one for alanine and two for glutamine) and expressed in nmoles excreted nitrogen per million cells.

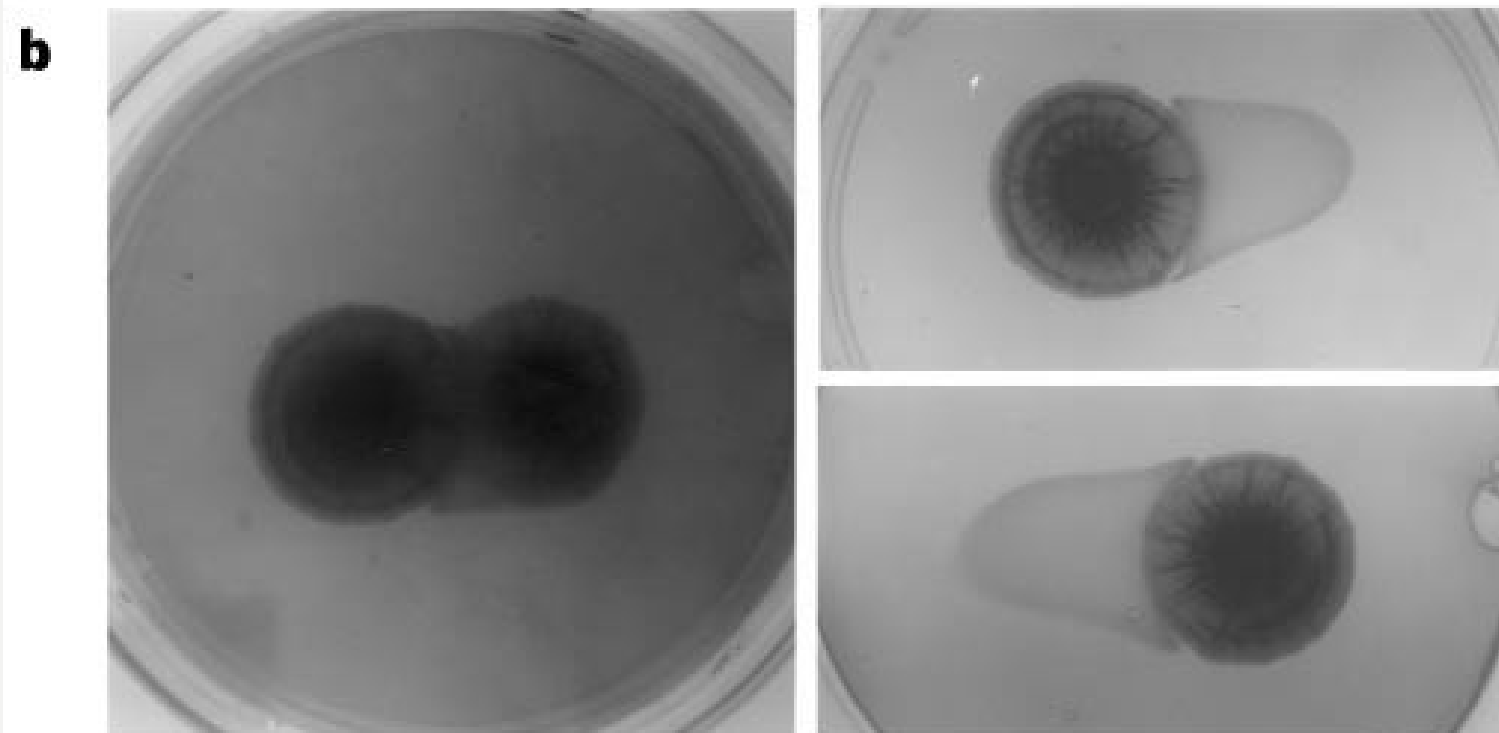
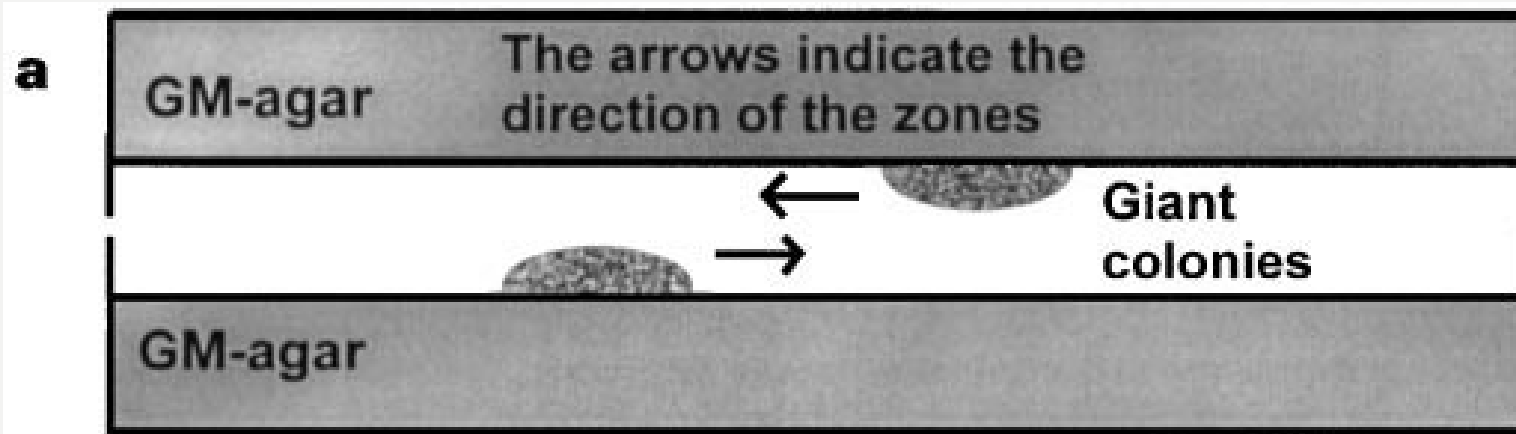
(A) Excreted amino acids for a range of potassium (same as the chemostats shown in Figure 1).

(B) Excreted amino acids were measured for a range of ammonium in 1.3 mM potassium (same as the chemostats shown in Figure 3).

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040351.g005



**Fig. 9.** A model for MEP2 regulation of pseudohyphal differentiation. Ammonium starvation is sensed via MEP2 to produce a signal that activates GPA2 and a signaling pathway that regulates filamentous growth independently of the MAP kinase cascade.



# AULA PRÁTICA

## A toxicidade da nutrição amoniacal em leveduras

### Objectivo:

Trata-se de uma aula de demonstração em que os alunos vão executar alguns procedimentos que no seu conjunto mostram a versatilidade das formas inorgânicas de azoto reduzido ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) como nutrientes, elementos tóxicos e sinalizadores num organismo modelo, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura).

## 1 - Inoculação de estirpes de *S. cerevisiae* cultivadas em meio de cultura SD com diferentes concentrações de N e K ( $\pm$ 60 min).

Foi delineado um dispositivo experimental baseado na hipótese de que baixas concentrações de potássio (1.3 mM) e elevadas concentrações de amónio (300 mM) no meio de cultura inibem o desenvolvimento das colónias de *S. Cerevisiae* estirpe 31019b. Porque é que o amónio a 300 mM é tóxico?

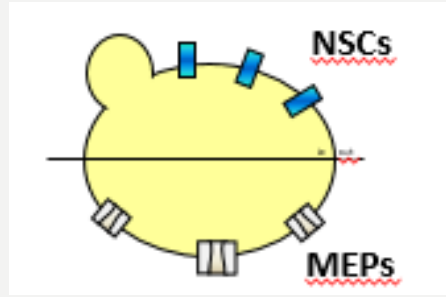
**Parâmetros a testar:** 2 concentrações de K<sup>+</sup> (1,3 e 13 mM) x 3 concentrações de amónio (1; 76 e 300 mM) x 2 leveduras (WT e 3 $\Delta$ MEP)

As leveduras são todas *Saccharomyces cerevisiae* haploides da estirpe 31019b (Marini et al 1997, Mol Cell Biol 17(8):4282).

**Procedimento:** Cada grupo vai inocular 36 caixas de Petri pelo método de espalhamento recorrendo a uma suspensão de células com DO de 1, e utilizando 20  $\mu$ L da suspensão por caixa. (6 com WT e 6 com  $\Delta$ MEP).

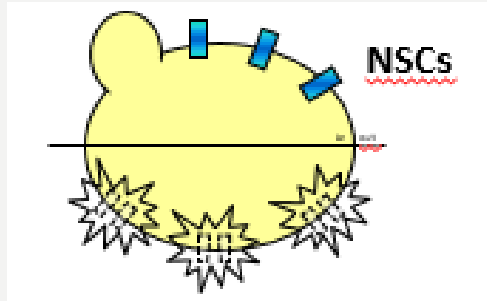


Wild type

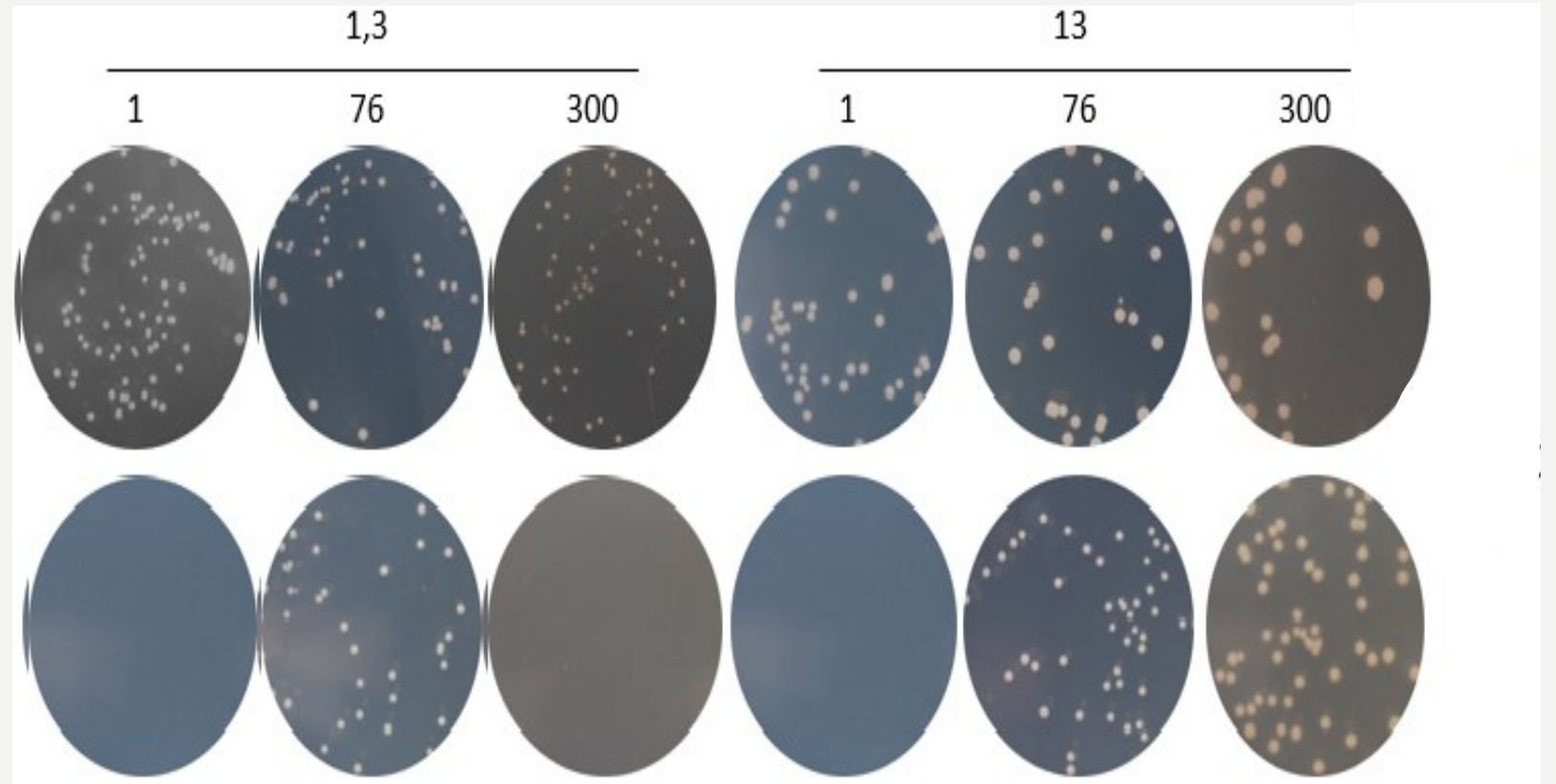


Both  $\text{NH}_4^+$  -  $\text{K}^+/\text{NH}_3$  mechanisms

**3  $\Delta$ MEP (triple mutant for MEPs)**



Only  $\text{NH}_4^+$  -  $\text{K}^+$  mechanism



		Conc. $\text{NH}_4^+$ (mM)		
<b>WT</b>	$\text{K}^+$ (mM)	<b>1</b>	<b>76</b>	<b>300</b>
	<b>1,3</b>			
	<b>13</b>			
<b><math>\Delta\text{MEP}</math></b>		<b>1</b>	<b>76</b>	<b>300</b>
	<b>1,3</b>			
	<b>13</b>			

## 2 - Crescimento das leveduras cultivadas em meio líquido com elevada concentração de potássio

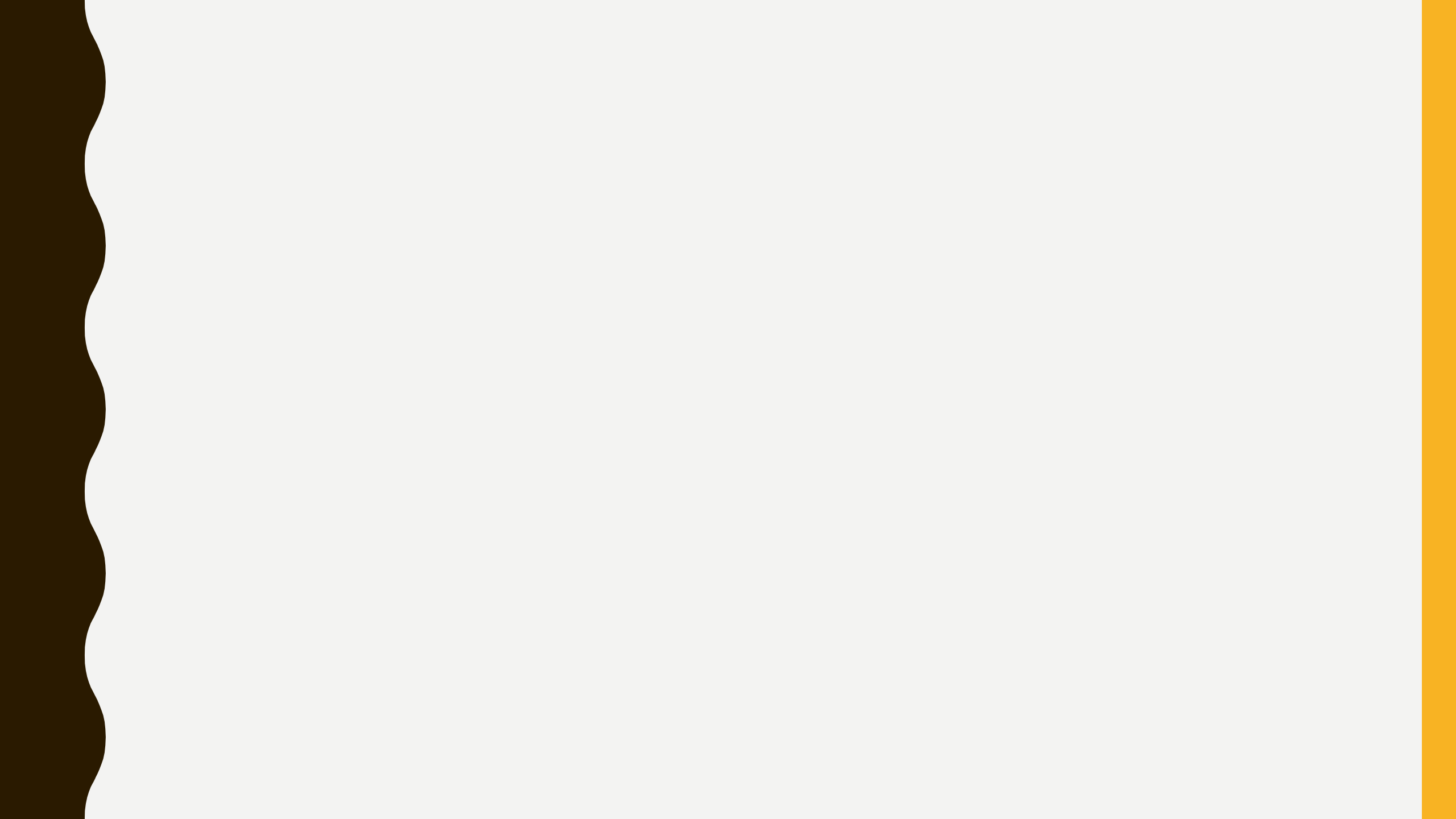
Com base nos resultados obtidos com as culturas em meio sólido estudar o crescimento (DO 600 nm) das culturas ao fim de 48 h em presença de baixas e altas concentrações de potássio (1,3 e 13 mM) e amónio (1; e 76 mM).

As leveduras a estudar são as mesmas da atividade 1 (WT e  $\Delta$ MEP).

**Procedimento:** Cada grupo tem 6 Erlenmeyers (3 WT e 3 $\Delta$ MEP ) e cada grupo faz uma combinação de potássio (1.3 ; 13 mM) e amónio (1 ou 76 mM).

Inocular 100  $\mu$ L de uma suspensão DO 1 no respectivo Erlenmeyer. Retirar uma amostra de 1 mL pra determinar a DO da cultura no tempo inicial. Guardar a amostra a -20 °C. Incubar a 28 °C, 180 rpm durante 48 h. Nessa altura as culturas são retiradas do agitador e colocadas no frio.

Na segunda aula, continuarão o protocolo com a determinação da DO do inicio e do final da experiência.



### 3 - Comunicação entre colónias ( $\pm$ 60 min)

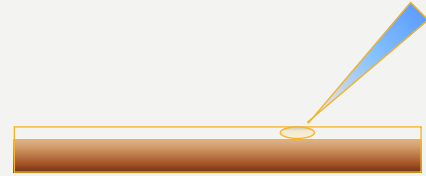
Muitas das colónias de microrganismos libertam  $\text{NH}_3$  como sinalizador da sua presença o que resulta na inibição do crescimento da colónia vizinha no sentido em que o espaço já está ocupado e por isso pode aumentar a competição. O objectivo desta actividade é perceber se o triplo mutante (que não possui MEP2, supostamente envolvido na sinalização amoniacal) é afectado na sua capacidade de detectar a presença de uma colónia na vizinhança. Partindo de culturas de WT e de Mut em meio (MPro) inoculam-se placas de Petri com uma única colónia e montam-se de acordo com o indicado na Figura 3 (Palková et al 1997). Este dispositivo assegura que a única comunicação entre as colónias seja feita através de compostos voláteis no qual se inclui a  $\text{NH}_3$ . Os controlos serão realizados com uma fonte de  $\text{NH}_3$  em substituição de uma das colónias, e de uma armadilha para o  $\text{NH}_3$  em outra caixa.

**Procedimento:** Cada grupo tem 10 caixas de Petri com Meio GMagar para testar a hipótese que tenha criado. Inocular as caixas de acordo com o esquema da figura. Os alunos dispõem de culturas em meio prolina das duas estirpes (WT e  $\Delta$ MEP), 1 frasco com discos de papel e soluções de amónio e ácido sulfúrico. Depois de efectuar as combinações desejadas, colocar as caixas na incubadora e observar ao fim de uma semana.

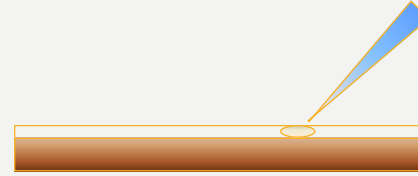
Inocular as caixas, colocando uma gota de cultura e um disco de papel com amónio ou com ácido sulfúrico. Crie os vários arranjos de que necessita para testar a hipótese.

Etapa 1: Inoculação

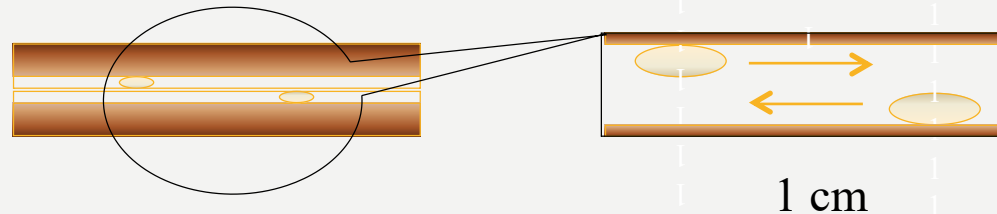
Caixa 1: estirpe (a)



Caixa 2: estirpe (b)

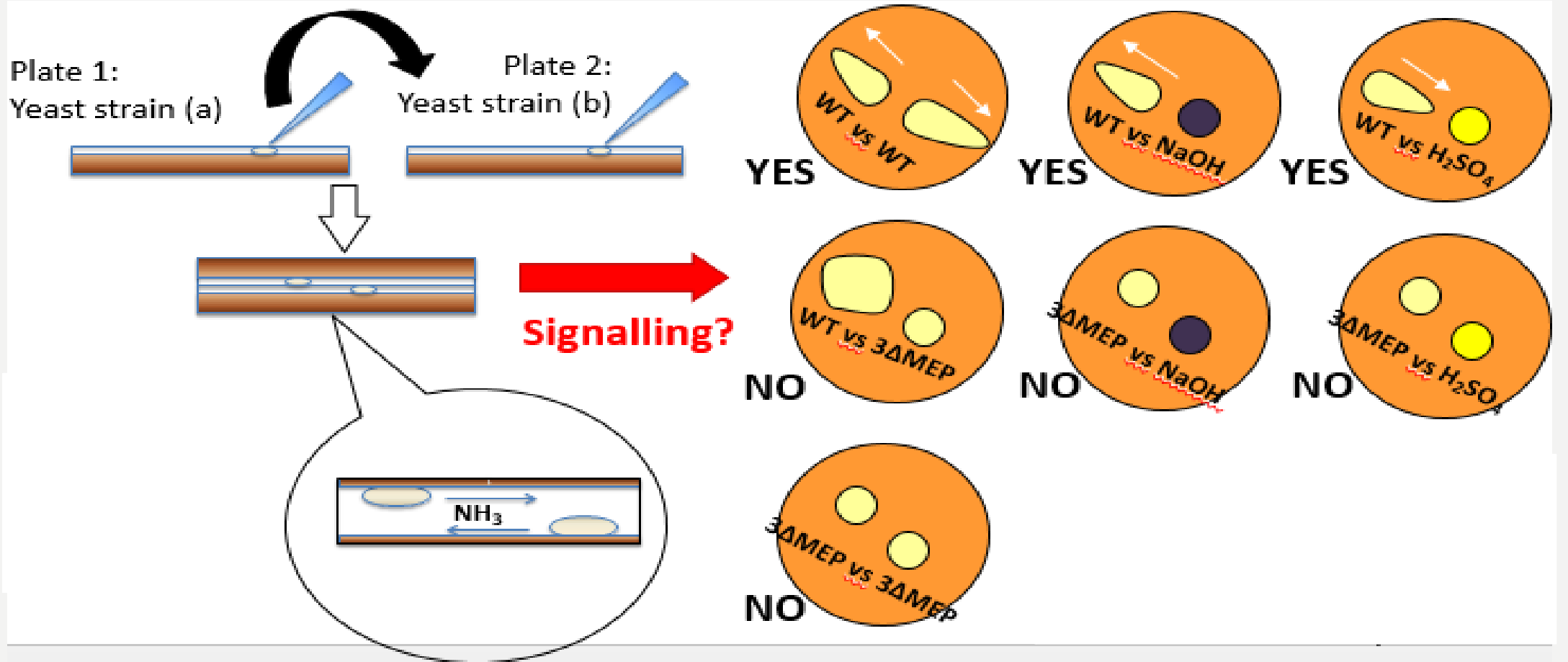


Etapa 2: Comunicação:



e (b) podem ser as estirpes WT, MUT, controles (fonte de  $\text{NH}_3$ : disco com  $\text{NaOH}$  no meio, armadilha para o  $\text{NH}_3$ : disco com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  no meio).





#### 4 - Amónio como indutor da resistência a antibióticos ( $\pm$ 60 min)

Muitas das colónias de microrganismos libertam  $\text{NH}_3$  como sinalizador da sua presença o que resulta na inibição do crescimento da colónia vizinha (atividade 3). Mas num meio fisicamente separado a amónia libertada por uma colónia pode interferir com as características da colónia vizinha, como por exemplo pode induzir resistência a antibióticos.

Pensa-se que esta resistência seja proveniente da indução da produção de poliaminas a partir da amónia, quando esta é detectada pelos transportadores específicos de amónio. O aumento da resistência a antibióticos foi observado em bactérias com transportadores activos. O objetivo desta atividade é perceber se a amónia também induz resistência a antifúngicos em leveduras e se o triplo mutante (que não possui MEPs activos) é afectado pela presença de amónia na sua capacidade de ter maior resistência a antifúngicos.

**Meio de cultura:** Meio MBA inoculado com *Bacillus* sp produtor de amónio. Meio NBA sem cultura. Solução estéril de amónio 5 mM. Meio prolina e meio prolina com pimaricina (antifúngico a 0,01%)

**Material Biológico:** Utilizar as duas leveduras (WT,  $\Delta$ MEP)

**Procedimento:** As culturas de leveduras e soluções de amónio são incubadas em caixas de Petri tripartidas (onde as culturas estão fisicamente separadas). As inoculações devem ser feitas de acordo com o esquema da Figura.

