



9
225-
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

LA VIA DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMINA -
 ω - AMIDASA EN Rhizobium phaseoli

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SOCORRO C. DURAN VARGAS



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	16
METODOS.....	17
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	30
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35

RESUMEN.

La glutamina, el producto final de la asimilación de amonio, es un compuesto clave en el metabolismo nitrogenado ya que sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas y además funciona como el correpresor del catabolismo nitrogenado. La regulación de la concentración intracelular de la glutamina es un proceso clave en el metabolismo nitrogenado ya que su concentración determina su utilización del nitrógeno del medio, la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular. A través de estudios bioquímicos y fisiológicos se han determinado las enzimas que participan en la asimilación de la glutamina. Se ha encontrado que la glutamina es asimilada por las enzimas de la vía de la transaminasa de glutamina-amidasa en la cuál la glutamina, a través de la participación de la transaminasa de glutamina, dona su nitrógeno amino para dar diferentes aminoácidos y 2-oxoglutamato, después por la acción de la ω -amidasa el 2-oxoglutamato es hidrolizado a 2-oxoglutarato y amonio. La glutamato sintasa también participa en la asimilación de la glutamina, dando dos moléculas de glutamato a partir de glutamina, 2-oxoglutarato y NADPH. Además se ha encontrado que el amonio liberado de la glutamina por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa es asimilado por la glutamino sintetasa.

INTRODUCCION

La composición química de los seres vivos es, cualitativamente, muy diferente de la del entorno físico en que viven. La mayor parte de los componentes químicos de los organismos son compuestos orgánicos de carbono en los que este elemento se encuentra en un estado relativamente reducido. Muchas de éstas moléculas contienen también nitrógeno como las proteínas, los ácidos nucleicos y otras biomoléculas importantes de los organismos vivos. Aunque el nitrógeno molecular se encuentra en gran cantidad en la atmósfera, es relativamente inerte desde el punto de vista químico y no puede ser utilizado por la mayor parte de los seres vivos. Es así, que los sistemas vivos (microorganismos y plantas) han desarrollado una serie de estrategias para buscar el nitrógeno y asimilarlo. Estas estrategias se traducen en diferentes procesos que comprenden la forma de buscarlo, incorporarlo a la célula, metabolizarlo para convertirlo en amonio, excretar el amonio al medio o asimilarlo en glutamato y glutamina, distribuir el nitrógeno presente en estos aminoácidos a través de enzimas que transaminan y transamidán, acumularlo en organelos específicos, sintetizar macromoléculas y finalmente degradar el nitrógeno celular para reciclarlo otra vez a amonio (1).

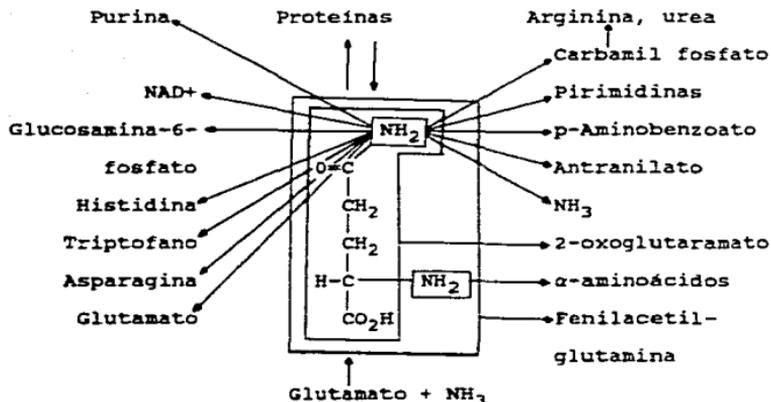
La asimilación del amonio, es el punto donde se fija el nitrógeno en moléculas orgánicas y de ahí se dis-

tribuye hacia la síntesis de compuestos nitrogenados que son utilizados en la síntesis de macromoléculas. Debido a lo anterior el proceso de asimilación del amonio es un punto clave del metabolismo celular donde se controla el resto de los procesos del metabolismo nitrogenado.

La deshidrogenasa glutámica (GDH-NADP) y la glutamino sintetasa (GS) son las únicas enzimas capaces de incorporar el amonio a moléculas orgánicas. La GDH-NADP cataliza la reacción para sintetizar glutamato a partir de 2-oxoglutarato NADPH y amonio. La GS sintetiza glutamina a partir de glutamato, amonio y ATP (2).

La glutamina, el producto final de la asimilación de amonio, es un compuesto clave dentro de este proceso ya que es uno de los donadores universales de nitrógeno y además es el correpresor del catabolismo nitrogenado, ya que su concentración determina la utilización del nitrógeno del medio, la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular, y la expresión de la nitrogenasa.

La glutamina además de ser requerida para la síntesis de proteínas sirve como donador de nitrógeno en una variedad de vías biosintéticas:



Así, el átomo de nitrógeno amido de la glutamina es usado para la síntesis de los átomos de nitrógeno amido del NAD y asparagina, los átomos de nitrógeno 3 y 9 del anillo de purinas, los grupos aminos de glucosamina, guanina, citosina, ácido p-aminobenzoico, el átomo de nitrógeno de carbamilfosfato (que es utilizado para la síntesis de arginina y el átomo de nitrógeno 1 del anillo de pirimidinas), el átomo de nitrógeno 1 del anillo de imidazol de histidina y el átomo de nitrógeno del pirrol de triptofano (3).

En diferentes sistemas celulares, se han encontrado diferentes actividades enzimáticas capaces de degradar glutamina: Transaminasas de glutamina, glutamato sintasa, glutaminasas, L-aminoácidos oxidasa y la vía de la

transaminasa de glutamina-~~o~~- amidasa (tabla 5).

Las transamidadasas son enzimas que catalizan la donación del grupo amido de la glutamina a un aceptor, dando como productos al aceptor con un grupo amino y glutamato. La mayoría de estas transamidadasas utilizan ATP.

La transamidasa más estudiada es la carbamil fosfato sintetasa de Escherichia coli (4, 5). Esta enzima tiene un peso molecular de 163,000 daltones y está compuesta por dos subunidades, una subunidad pesada de 130,000 daltones y una subunidad ligera de 40,000 daltones(6).

La glutamato sintasa es una transamidasa que cataliza la transamidación reductiva de la glutamina con el 2-oxoglutarato para dar 2 moléculas de glutamato. Esta enzima sólo se encuentra en microorganismos y plantas. El hecho de que mutantes de Bacillus subtilis, que carecían de la actividad de glutamato deshidrogenasa y de alanina deshidrogenasa, crezcan en medio mínimo (7) y de que en Aerobacter aerogenes la síntesis de glutamato deshidrogenasa puede estar totalmente reprimida sin afectar la capacidad de este microorganismo para asimilar amonio (8), llevó a la demostración de que existe otra vía para asimilar amonio. En esta vía el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa para dar glutamina y después la glutamato sintasa lleva a cabo la transamidación reductiva de este aminoácido dando dos moléculas de glutamato.

Las glutaminasas son enzimas que catalizan la deaminación hidrolítica de la glutamina dando como productos glutamato y amonio. La actividad de glutaminasa se encuentra en una gran cantidad de microorganismos (9). Las mejor estudiadas son las glutaminasas de Escherichia coli. Estas bacterias tienen dos glutaminasas que se distinguen por su pH óptimo; la glutaminasa A tiene un pH óptimo de 5, mientras que la glutaminasa B tiene un pH óptimo de 7 (10).

Las L-aminoácidos oxidasas catalizan la desamidación oxidativa de los L-aminoácidos. La L-aminoácido oxidasa de Neurospora crassa es capaz de desaminar oxidativamente a la glutamina con una actividad 50% menor que la que presenta con la histidina, que es el mejor sustrato de esta enzima (11).

La síntesis de esta enzima requiere tanto de la inducción por un aminoácido, así, como simultáneamente de la derepresión catabólica nitrogenada (8). La limitación de carbono en presencia de un aminoácido como inductor no permite la inducción de la L-aminoácido oxidasa. Los inhibidores de la síntesis de proteínas y de la síntesis de RNA bloquean la acumulación de la L-aminoácido oxidasa, lo que sugiere que la expresión de esta enzima es controlada a nivel de su transcripción (8).

La transaminasa de glutamina fue descubierta en el curso de estudios enzimáticos de la desamidación de

glutamina. Greenstein y colaboradores (12) descubrieron que la formación de amonio a partir de glutamina, utilizando extractos de hígados de rata, se estimulaba notablemente por la adición de piruvato y algunos otros 2-oxoácidos. La reacción dependiente de 2-oxoácidos fue denominada glutaminasa II.

Meister y Tice (13) encontraron que el piruvato (determinado con la lactato deshidrogenasa) desaparecía, mientras que el total de 2-oxoácidos (determinado por la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazonas de 2-oxoácidos) permanecía sin cambios y al final de la reacción se recuperaba el 2-oxoglutarato como su correspondiente 2,4-dinitrofenilhidrazona. Estos autores también establecieron mediante estudios con glutamina¹⁵N en el grupo amido, que el amonio formado proviene del grupo amido de la glutamina. En este y en otros trabajos se encontró que un gran número de 2-oxoácidos pueden reemplazar el piruvato y que la desaparición del piruvato u otros 2-oxoácidos se acompaña de la formación equimolar del correspondiente L-aminoácido. La formación de amonio no ocurría en ausencia de 2-oxoácido y sólo algunos de estos compuestos estimulaban su formación (13).

La transaminación se disminuía notablemente cuando se reemplazaba la glutamina por el glutamato. En el caso en que se usaba como sustrato γ -metilglutamina, la transamina

ción ocurría pero no había formación de amonio y se formaba el α -ceto- γ -metilglutamato (14). Estos resultados fueron interpretados de la manera siguiente:

Primero ocurría una reacción de transaminación entre la glutamina y el 2-oxoácido que resultaba en la formación del correspondiente α -aminoácido y del 2-oxoglutamato (reacción 1). A continuación, en una segunda reacción de ω -deamidación en la cual el 2-oxoglutamato se convertía en 2-oxoglutarato y amonio (reacción 2).



Esta hipótesis fue confirmada cuando se encontró que el 2-oxoglutamato (preparado por oxidación enzimática de la L-glutamina) es hidrolizado en 2-oxoglutarato y amonio por preparaciones que también catalizan la reacción de transaminación deamidación de glutamina (15). La ω -amidasa de estas preparaciones, no hidroliza el α -ceto- γ -metilglutamato (14). A partir de estos resultados se purificó parcialmente la ω -amidasa del hígado de rata y además se separó de la transaminasa de glutamina (16). Se encontró que la ω -amidasa hidroliza otras amidas como 2-oxosuccinamato, succinamato y glutaramato, pero es inactiva cuando se usan como sustratos glutamina y asparagina. En estudios con extractos de N. crassa se demostró que la

transaminación entre 2-oxosuccinamato y glutamina resultaba en la formación de 2-oxoglutaramato y asparagina (17). Se ha encontrado que el 2-oxoglutaramato puede existir en dos formas interconvertibles. Una forma exhibe las propiedades esperadas para un 2-oxoácido de cadena abierta análogo a la glutamina; la otra forma reacciona lentamente con 2,4-dinitrofenilhidrazina y no es descarboxilada por peróxido de hidrógeno (18). Se demostró posteriormente que la forma poco reactiva del 2-oxoglutaramato es la 2-hidroxi-5-oxo-prolina que no es sustrato de la ω -amidasa (19). El equilibrio entre la cadena abierta y la forma cíclica está marcadamente en favor de la última en condiciones fisiológicas. Así, más del 99% del compuesto existe en la forma cíclica.



Más información sobre esta vía del metabolismo de la glutamina se obtuvo después de purificar la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa.

En 1971, la ω -amidasa fue purificada y se obtuvo en forma homogénea por Hersh (20). La transaminasa de glutamina soluble, presente en el hígado de la rata, fue purificada por Cooper y Meister en el mismo año (14, 21).

Estudios realizados por Price y Greenstein (22) demostraron que la actividad de la transaminasa era mayor en el hígado que en el riñón de la rata. Sin embargo, Krupchik y Knox (23, 24), con una preparación más pura de riñón de rata, encontraron una actividad específica 6 veces mayor que aquella presente en el hígado de la rata. Estos resultados aparentemente conflictivos, fueron resueltos en trabajos posteriores (25). Así Kupchik y Knox (23, 24) medían la transaminación entre glutamina y fenilpiruvato, mientras que Price y Greenstein medían la transaminación entre glutamina y piruvato. Investigaciones sobre la especificidad de la transaminasa por estos 2-oxoácidos demostraron que los extractos de riñón eran menos activos que los del hígado en la transaminación entre glutamina y piruvato, y más activos que los extractos del hígado en la transaminación entre glutamina y fenilpiruvato. Estos resultados culminaron en el aislamiento de una nueva transaminasa de glutamina de riñón de rata, y con la demostración de que las dos transaminasas estaban presentes, aunque en diferente proporción, en hígado y en riñón (25).

La transaminasa de glutamina de hígado (transaminasa de glutamina L) es más activa con α -ceto- β -metiolbutirato, β -mercaptopiruvato, glioxalato, piruvato y β -hidroxipiruvato. La transaminasa de glutamina de riñón (transaminasa de glutamina K) es más activa con metionina,

fenilalanina, tirosina y los α -cetoácidos análogos a estos aminoácidos. Por otro lado, esta enzima exhibe menos actividad con glioxalato y piruvato (25).

Las transaminasas de glutamina K y L, están presentes en la mitocondria y en el citosol del hígado y el riñón (25). Igualmente se ha demostrado que la ω -amidasa está presente tanto en la porción soluble como en la mitocondria.

La transaminasa de glutamina y la ω -amidasa de Neurospora crassa participan en un ciclo donde la glutamina es degradada y resintetizada (26).

Se encontró que la glutamina es degradada a amonio y 2-oxoglutarato a través de las enzimas de la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa. En esta vía la glutamina transamina para dar diferentes aminoácidos y 2-oxoglutaramato a través de la participación de la transaminasa de glutamina, después, el 2-oxoglutaramato formado es hidrolizado por la ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio (26). En este hongo la glutamina es asimilada directamente a nitrógeno α amino por la acción de la glutamato sintasa que da 2 moléculas de glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato (27, 28). El amonio liberado por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa es reasimilado por la deshidrogenasa glutámica para dar glutamato y por la glutamino sintetasa para resintetizar glutamina. Esto da

lugar a la operación de un ciclo en el cual la glutamina es degradada y resintetizada, la glutamato sintasa también participa en ciclar glutamina a glutamato (28, 29), como resultado del ciclaje de la glutamina, este aminoácido y el glutamato son continuamente resintetizados (28, 29) con el correspondiente gasto de esqueletos de carbono, poder reductor y ATP (30, 31). En N. crassa no se detecta actividad de glutaminasa y experimentos de marcaje demuestran que esta vía no opera en la degradación de la glutamina. Los estudios sobre la función del reciclaje de la glutamina han demostrado que este es necesario para el óptimo flujo de carbono a partir de sacarosa (31, 32). Se ha encontrado que para que la glutamina sea asimilada óptimamente como fuente de nitrógeno esta tiene que convertirse a glutamato que es el otro donador de nitrógeno (28). La actividad de la glutamato sintasa y la incorporación del amonio liberado por la vía de la transaminasa de glutamina- α -amidasa a través de la deshidrogenasa glutámica son esenciales para la síntesis de glutamato, mientras que la contribución de las transamidases es pequeña (28, 29).

La presencia de 2-oxoglutarato en presencia de amonio(26) y los estudios de marcaje con glutamina ^{15}N muestran que el reciclaje de la glutamina está operando entre glutamato y glutamina (30).

Tomando a Neurospora crassa como modelo se

aplicará este conocimiento en una bacteria de gran interés biotecnológico para la agricultura Rhizobium phaseoli que es una bacteria fijadora de nitrógeno en asociación con Phaseolus vulgaris (frijol), leguminosa de gran importancia económica.

Rhizobium phaseoli es una bacteria gram negativa que se caracteriza por inducir el desarrollo de nódulos en las raíces de la planta que infecta, en estas estructuras se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (33).

Rhizobium phaseoli es capaz de utilizar diferentes compuestos como fuente de nitrógeno y la utilización de estos compuestos implica su degradación a amonio, precursor de la síntesis de glutamina para así distribuir el nitrógeno de estos aminoácidos a todos los compuestos nitrogenados (34).

Entre los aminoácidos que Rhizobium phaseoli puede utilizar como fuente de nitrógeno se encuentra la glutamina, sin embargo, la utilización de este aminoácido no implica necesariamente su degradación a amonio, ya que al donar su grupo amido mediante reacciones de transamidación forma glutamato.

En Rhizobium phaseoli se ha reportado la existencia de la actividad de glutamino sintetasa (GS). Rhizobium tiene dos glutamino sintetetasas las cuales tienen diferentes propiedades físicas y catalíticas (35). La GS I es muy parecida a la enzima encontrada en E. coli con una

estructura oligomérica formada por 12 subunidades, es resistente al calor y está sujeta a regulación por adenilación (36). Por otro lado la GS II tiene un peso molecular más bajo, es sensible a temperatura y está formada por 8 subunidades (37).

También se ha reportado la actividad de glutamato sintasa (GOGAT) como una vía en la degradación de glutamina en Rhizobium phaseoli.

La actividad de GOGAT es mayor cuando se usa glutamina ó amonio como fuente de nitrógeno que cuando se usa glutamato (34).

Sin embargo en Rhizobium phaseoli no se ha reportado la existencia de la deshidrogenasa glutámica (GDH) (34). En otras especies de Rhizobium como R. japonicum, R. leguminosarum y R. trifoli si se ha logrado detectar actividad de GDH, pero como es dependiente del cofactor NADH y no está regulada negativamente por glutamato, se le ha asignado un papel catabólico (38, 39). En R. leguminosarum y R. trifoli se ha encontrado una actividad de GDH biosintética dependiente de NADPH, que aumenta en condiciones de limitación de glucosa (38). Es importante mencionar que se han aislado mutantes auxótrofas de glutamato, que no asimilan amonio en R. leguminosarum, R. japonicum, R. cowpea, R. trifoli, R. meliloti y R. sesbania y que son

deficientes en la actividad de GOGAT sin tener afectada su GDH (40, 41, 42). Este dato apoya que la vía de asimilación de amonio en Rhizobium es la vía GS-GOGAT, ya que si la GDH y la GOGAT participaran en la síntesis de glutamato, mutantes auxótrofos de glutamina deberían tener alteradas las dos actividades.

Otra enzima que no se ha reportado en Rhizobium phaseoli es la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amida sa.

OBJETIVOS.

El papel de la glutamina es fundamental en el metabolismo celular por lo que es importante conocer como se asimila este aminoácido, para ello se plantean los siguientes objetivos.

A) Demostrar si opera la vía de la transaminasa - ω -amidasa en Rhizobium phaseoli.

b) Demostrar si opera el reciclaje de la glutamina en Rhizobium phaseoli.

Estos objetivos forman parte de un proyecto general sobre las vías que participan en la asimilación de la glutamina, su regulación, su función y determinar si opera el reciclaje de la glutamina en Rhizobium phaseoli en vida libre y en simbiosis con Phaseolus vulgaris, así como la relación que existe entre la degradación de la glutamina y la fijación de nitrógeno.

Este conocimiento podrá ser aplicado para obtener cepas incrementadas en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y por lo tanto incrementar la productividad de las cosechas de frijol.

METODOS.

CEPAS.

Se trabaja con la cepa silvestre Rhizobium phaseoli CFN42, resistentes a ácido nalidixico y estreptomina y con la cepa HB101 de Escherichia coli resistente a estreptomina.

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Las células de la cepa CFN42 son precrecidas 14 hrs en medios ricos (extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 0.5% y cloruro de calcio 0.7M) a 30°C agitándose a una velocidad de 200rpm.

Con estas células se inoculan medios mínimos (potasio dibásico 1.2mM, sulfato de magnesio 0.8mM, cloruro de calcio 150mM, y cloruro de fierro 18mM) a una densidad óptica de 0.05 a 540nm. Al medio mínimo se le adiciona como fuente de carbono succinato 10mM (a excepción de los casos que se especifique) y como fuente de nitrógeno glutamina 10mM ó glutamato 10mM ó nitrato de potasio 10mM ó cloruro de amonio 10mM.

Las células de la cepa HB101 son precrecidas 12 hrs en medios de Luria (extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1% y cloruro de sodio 1% ajustando el pH a 7.5) a 37 C agitándose a una velocidad de 250rpm.

Con estas células se inoculan medios mínimos

(fosfato de sodio 0.6%, fosfato de potasio 0.3%, cloruro de sodio 0.5%, sulfato de magnesio 0.025% ajustando a pH 7.5) a una densidad óptica de 0.05 a 540 nm. Al medio se le adiciona como fuente de nitrógeno glutamina 10mM y como fuente de carbono succinato 10 mM.

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO.

Las cinéticas de crecimiento se sigue por densidad óptica y por proteína.

Para densidad óptica se toma 1ml de cultivo y se lee a 540nm.

Para proteína se toma 1ml de cultivo, se centrifuga 10 minutos a 10,000rpm y se resuspende en 500µl de ácido tricloroacético al 5%, se vuelve a centrifugar y se resuspende en 200µl de hidróxido de sodio 0.4N y se determina proteína por el método de Lowry a 625nm (43).

DETERMINACION DE AMONIO EXTRACELULAR.

Se toman 10ml de cultivo, se centrifugan 10 minutos a 10,000rpm al sobrenadante se le agrega 100µl de hidróxido de sodio 10M y se mide amonio con un electrodo Orión con una membrana específica para este compuesto.

PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES.

Se centrifugan 250ml de medio 10 minutos a 10,000rpm se lavan las células con agua. El pellet se resuspende en 1.5ml de buffer de extracción (Pirofosfato de sodio 0.05M y β -mercaptoetanol 10mM a pH 8.5) y se rompen las células en el desintegrador Braun dando 5 pulsos de 90 segundos utilizando perlas de vidrio de 0.1mm de diámetro en una proporción de un volumen de perlas por tres volúmenes de células.

Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 10,000rpm para desechar las membranas celulares. El sobrenadante se utiliza para las determinaciones enzimáticas.

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRANSAMINASA DE GLUTAMINA.

La actividad de transaminasa de glutamina se determina midiendo la acumulación de 2-oxoglutamato colorimetricamente a 500nm.

La reacción se corre con 100 μ l de extracto celular más 400 μ l de coctel (6-diaxo-5-oxo-norleucina (DON) 6mM, glutamina 0.2M, glioxalato 0.2M, ácido bórico 0.75M a pH 8.5, fosfato de piridoxal 2mM y agua) a 37°C hasta 90 minutos y se para la reacción con 100 μ l de ácido sulfucialicílico al 20%, se centrifuga 15 minutos a 3000rpm y se decanta, se adicionan 250 μ l de una solución al 4.5% de vainillina en

ácido clorhídrico 3N y etanol al 50% se calienta 30 minutos a 92°C y se adiciona 250µl de hidróxido de sodio 5N y se lee a 500nm.

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA REACCION ACOPLADA DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMINA Y LA ω-AMIDASA.

La actividad acoplada de la transaminasa de glutamina y la ω-amidasa se determina midiendo la formación de amonio por medio de la deshidrogenasa glutámica (bovina) a 340 nm.

La reacción se corre en las mismas condiciones de la transaminasa de glutamina, excepto que la reacción se para con 100µl de ácido tricloroacético al 17%, se centrifuga 15 minutos a 3000rpm, el sobrenadante se neutraliza a pH 7 con NaOH se toman 500µl de ésta mezcla y se agregan 500µl de coctel (Tris 250mM, 2-oxoglutarato 200mM, NADH 10mM y agua), se corre la reacción con 5µl de deshidrogenasa glutámica (bovina) y se lee la desaparición de NADH a 340nm que corresponde a la cantidad de amonio formado.

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTAMINO SINTETASA.

La actividad de glutamino sintetasa se determina midiendo la producción de L-glutamil hidroxamato espectrofotométrica mente a 540nm.

Las actividades de glutamino sintetasa I y II son medidas por los ensayos de transferasa y sintetasa, las que se distinguen por su diferente estabilidad a 50°C (34).

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTAMATO SINTASA.

La actividad de glutamato sintasa se determina siguiendo la oxidación de la coenzima NADPH espectofotométricamente a 340nm (34).

SINTESIS DE 2-OXOGLUTARAMATO.

Este compuesto se sintetiza a partir de 5grs. de glutamina, 2grs. de L-aminoácido oxidasa, 10,000 unidades de catalasa y 100ml de agua ajustando el pH 7.2 incubando a 37°C con burbujeo de oxígeno durante 24 hrs.

Se dializa en 1 litro de agua a 5°C durante 12 hrs. Esta muestra se liofiliza hasta aproximadamente 100ml, se pasa por una columna Dowex 50H+, se eluye con agua, se recolecta la muestra, se mide el pH, se juntan las fracciones acidas se neutralizan con hidróxido de bario y se liofiliza.

La pureza del 2-oxoglutaramato obtenido se determina por cromatografía en papel y en líquido.

Para la cromatografía en papel la muestra se corre en una mezcla de solventes con 40ml de terbutanol, 30ml de metietil cetona, 15ml de ácido fórmico y 15ml de agua. Se

tiñe con vainillina (1% vainilla en etanol 50% y ácido clorhídrico 1N) se deja secar 1hr a 92°C y se vuelve a teñir con hidróxido de sodio 0.5N en etanol 50%.

Para la cromatografía en líquido de alta presión se utiliza una columna Radial pack (Millipore) C18 (fase reversa) y se eluye con hidróxido de tetrabutil amonio en un buffer fosfatos 1mM a pH 7.1 y se determina la absorbancia a 214nm.

DETERMINACION DE 2-OXOGLUTARAMATO In vivo.

Para esta determinación las células se crecen en medio mínimo suplementado con glutamina ó amonio como fuente de nitrógeno durante 12 hrs , para que se acumule ópticamente el 2-oxoglutaramato proveniente de la reacción de la transaminasa de glutamina es necesaria la presencia de DON 1mM que es un inhibidor de transaminasas, aminooxiacético 10mM inhibidor de transaminasas y una mezcla de DON y AOA y se incuban durante 6 hrs.

Las muestras son centrifugadas 10 minutos a 10,000rpm, el pellet se resuspende en 10ml de alcohol al 80%, se hierve 10 minutos, se homogeniza en el Braun, se filtra (membrana 1.2µm) y se liofiliza. La muestra se disuelve en 2ml de agua, se pasa por una columna DOWEX-1 y se eluye con 6ml de ácido clorhídrico 1N se juntan las fracciones ácidas, se neutralizan con hidróxido de sodio y se

liofiliza. El compuesto se disuelve en 2ml de agua.

El 2-oxoglutamato se determina por cromatografía de líquidos de alta presión como se menciona anteriormente.

RESULTADOS.

CRECIMIENTO DE Rhizobium phaseoli EN DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO.

Se crece Rhizobium phaseoli en medio mínimo suplementado en diferentes fuentes de nitrógeno glutamina 10mM, glutamato 10 mM y nitrato de potasio 10 mM y en glutamina 10 mM como fuente de nitrógeno y carbono. Se encontró que para Rhizobium phaseoli la mejor fuente de nitrógeno es glutamina y que además es capaz de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono (fig. 1). Comparandola con otra bacteria gram negativa como E. coli se observa que ésta bacteria crece menos en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, lo que le confiere una característica particular a Rhizobium phaseoli (fig. 2).

ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA DE GLUTAMINA Y ACTIVIDAD DE LA REACCION ACOPLADA DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMINA Y LA ω -AMIDASA.

La actividad de la transaminasa de glutamina se determina creciendo células en medio mínimo suplementado con glutamina y succinato a las 14hrs de crecimiento a 30°C. Se determina la acumulación de 2-oxoglutaramato colorimetricamente a 540 nm. Se detecta una actividad de 10.5 nanomoles de 2-oxoglutaramato producido por minuto por miligramo de

proteína , en presencia de aminoácético inhibidor de la transaminasa de glutamina se detecta una actividad de 0.84 y cuando la reacción se lleva a cabo sin DON que inhibe la ω -amidasa se detecta un tercio del total de la actividad, lo que significa que la ω -amidasa está hidrolizando el 2-oxoglutarato a 2-oxoglutarato mas amonio y no se detecta actividad cuando la reacción se corre sin alguno de los sustratos glutamina ó glioxalato (tablas 1 y 5).

Estos resultados indican que en la degradación de la glutamina participa la reacción acoplada de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa. Esta actividad enzimática acoplada se determina midiendo la formación de amonio por medio de la deshidrogenasa glutámica (bovina) a 340nm en medio mínimo suplementado con glutamina a las 14 hrs de crecimiento a 30 °C. Se detecta una actividad de 4.3 nanomoles de amonio producido por minuto por miligramo de proteína , no se detecta actividad sin la presencia de alguno de los sustratos (glutamina ó glioxalato), en presencia de aminoácético inhibidor de la transaminasa de glutamina no se detecta actividad ya que la glutamina no puede ser degradada a 2-oxoglutarato y en presencia de DON inhibidor de la ω -amidasa no se detecta actividad enzimática ya que el 2-oxoglutarato producto de la degradación de la glutamina por la transaminasa de glutamina no puede ser hidrolizado por la ω -amidasa a 2-oxoglutarato mas amonio

(tablas 2 y 5).

EXCRECION DE AMONIO E INHIBICION DE LA EXCRECION DE ESTE COMPUESTO EN Rhizobium phaseoli CRECIDO EN GLUTAMINA MAS SUCCINATO Y GLUTAMINA COMO FUENTE DE NITROGENO Y CARBONO.

Para medir la excreción de amonio se crecen células en medio mínimo suplementado con glutamina, nitrato de potasio y glutamina como fuente de nitrógeno y carbono durante 36 hrs. Se encontró que la excreción de amonio es 78 μ moles por miligramo de proteína en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono y sólo de 18 en glutamina y en nitrato de potasio la excreción de amonio es mínima, estos resultados indican que el amonio presente se debe a la degradación de la glutamina. También es importante resaltar que la excreción de amonio en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono se detecta desde las primeras horas de crecimiento y en glutamina ésta inicia después de las 12 hrs (fig. 3).

Para inhibir la excreción de amonio se crecen células en medio mínimo suplementado con glutamina y en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono durante 12 hrs, las células son transferidas a otros medios mínimos con glutamina y glutamina como fuente de nitrógeno y carbono más aminooxiacético 10 mM ó DON 1 mM. Se mide excreción de amonio a las 7 hrs y se detectan 3.5 μ moles de amonio por

miligramo de proteína en glutamina, en presencia de aminoácético ó DON se inhibe la excreción de amonio, y sin fuente de nitrógeno no se detecta excreción de amonio (fig. 4). En glutamina como fuente de nitrógeno y carbono se detectan 30 μ moles de amonio por miligramo de proteína y se inhibe la excreción en presencia de aminoácético ó DON y sin fuente de nitrógeno no se detecta excreción de amonio (fig 5). Estos resultados confirman que la glutamina es degradada a amonio por medio de la reacción acoplada de la transaminasa de glutamina y ω -amidasa y que no participan las enzimas L-aminoácido oxidasa porque en presencia de aminoácético ó DON no se detecta excreción de amonio, ni glutaminasas porque en presencia de aminoácético no hay excreción de amonio. Y además se demuestra que en glutamina y en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono está presente la misma vía de degradación de la glutamina (figs 4 y 5).

DETERMINACION DE 2-OXOGLUTARAMATO IN VIVO.

Sintetizado el 2-oxoglutarato se determina su pureza por cromatografía en papel y en líquido con un resultado del 97.81%.

Para la determinación in vivo las células se crecen en medio mínimo suplementado con glutamina ó amonio durante 12 hrs, las células se colectan y se transfieren a

otro medio mínimo suplementado con glutamina ó amonio más aminoociacético inhibidor de la transaminasa de glutamina ó DON inhibidor de la ω -amidasa

Se mide la acumulación del 2-oxoglutarato por medio del HPLC, se detecta en presencia de DON y aminoociacético la acumula del 2-oxoglutarato lo que demuestra la participación de la vía de la transaminasa de glutamina- ω --amidasa. Y la acumulación del 2-oxoglutarato en amonio demuestra que la glutamina es degradada y resintetizada (tabla 3).

RECICLAJE DE LA GLUTAMINA.

La presencia de amonio extracelular hasta después de las 12 hrs en glutamina (fig 3) sugirió dos posibilidades:

- a) Qué el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa para resintetizar glutamina durante las primeras 12 hrs.
- b) Qué la actividad enzimática de transaminasa de glutamina se induce hasta después de las 12 hrs y que el amonio en exceso es excretado al medio.

Para demostrar una de estas posibilidades, se mide la excreción de amonio en glutamina, glutamina más metionina sulfoximina (inhibidor irreversible de la glutamino sintetasa) y sin fuente de nitrógeno durante las primeras 12 hrs de crecimiento. En presencia de metionina

sulfoximina se detecta excreción de amonio lo que indica que la glutamino sintetasa esta inhibida y no puede asimilar el amonio para resintetizar glutamina y este amonio es excretado al medio (fig. 6)

Se mide la actividad de glutamino sintetasa por el ensayo de sintetasa y transferasa en medio mínimo suplementado con glutamina y glutamina como fuente de nitrógeno y carbono durante 24 hrs. En glutamina se detecta actividad de glutamino sintetasa I adenilada y por lo tanto inactiva y glutamino sintetasa II que se eleva hasta las 12 hrs y después cae. En glutamina como fuente de nitrógeno y carbono se detecta actividad de glutamino sintetasa I adenilada y no se detecta actividad de glutamino sintetasa II (figs 7 y 8).

Se mide la actividad de transaminasa de glutamina en células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina y glutamina como fuente de nitrógeno y carbono a las 14 hrs a 30 °C, en donde la actividad enzimática es similar en ambas condiciones. Y por último se mide actividad de glutamato sintasa en medio mínimo suplementado con glutamina y glutamina como fuente de carbono y nitrógeno a las 14 hrs a 30 °C, en donde se detecta una actividad de 27.1 nanomoles de NADH oxidado por minuto por miligramo de proteína en glutamina y sólo 14.1 en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono (tabla 4).

DISCUSION.

La transaminasa de glutamina es una enzima que permite a la glutamina donar su nitrógeno amino para dar diversos aminoácidos. Además, esta transaminación es irreversible debido a que el 2-oxoglutarato formado, se cicliza espontáneamente y no es sustrato de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa tiene una gran afinidad por el 2-oxoglutarato. Sólo la forma abierta es hidrolizada por la ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio (19). Todas las demás transaminasas conocidas son reversibles y poseen una constante de equilibrio alrededor de 1.0. Otra característica que distingue a la transaminasa de glutamina de las demás, es que tiene afinidad y transamina eficientemente con muy diversos 2-oxoácidos (20).

El objetivo de este trabajo es conocer la participación de la reacción acoplada de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa en la degradación de la glutamina, así como el reciclaje de ésta en Rhizobium phaseoli.

Las vías posibles por las que la glutamina puede ser degradada en Rhizobium phaseoli son las siguientes.

a) Por una transaminasa de glutamina y la ω -amidasa en que a partir de la glutamina se obtiene amonio y 2-oxoglutarato (14).

b) A través de la glutamino sintasa que en presencia de glutamina y 2-oxoglutarato sintetiza 2 moléculas de

glutamato (33).

c) Otra enzima que puede participar, pero no en la degradación sino en la síntesis de glutamina es la glutamino sintetasa que a partir de glutamato y amonio sintetiza glutamina (34).

Los resultados indican que para Rhizobium phaseoli la mejor fuente de nitrógeno es la glutamina y que además es capaz de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono a diferencia de otras bacterias gram negativas como E. coli (fig 2).

La actividad enzimática de la transaminasa de glutamina y ω -amidasa ha sido reportada en Saccharomyces cerevisiae con una actividad de 8.24 nanomoles de 2-oxoglutamato producido por minuto por miligramo de proteína (45) y Neurospora crassa con 6.0 nanomoles de fenilalanina por minuto por miligramo de proteína. Los resultados muestran que esta actividad enzimática también se encuentra presente en Rhizobium phaseoli con 4.3 nanomoles de 2-oxoglutamato producido por minuto por miligramo de proteína (tabla 2). La inhibición de la excreción de amonio por aminooxiacético inhibidor de la transaminasa de glutamina y DON inhibidor de la ω -amidasa (figs 4 y 5), además de la acumulación de 2-oxoglutamato in vivo demuestran la participación de la reacción acoplada de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa en la degradación

de la glutamina.

En Rhizobium phaseoli se ha reportado la actividad de glutamino sintetasa en glutamina (34), en el presente trabajo se reporta esta actividad en glutamina y en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. La actividad enzimática de glutamino sintetasa II en glutamina se encuentra presente durante las primeras 12 hrs de crecimiento durante esta fase el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa para resintetizar glutamina, después de las 12 hrs la actividad de glutamino sintetasa II cae ya no asimila amonio y éste es excretado al medio (figs 7 y 8). La actividad de glutamino sintetasa II en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono no se detecta (fig 7 y 8). En esta condición el amonio no es asimilado para resintetizar glutamina y es excretado al medio a partir de las primeras horas de crecimiento (fig 3) encontrándose una actividad diez veces mayor que en glutamina (fig 4 y 5).

La actividad de ésta enzima queda demostrada con la presencia de metionina sulfoximina (inhibidor irreversible de la glutamino sintetasa) durante las primeras 12 hrs de crecimiento en donde el amonio es excretado al medio como resultado de la inhibición de la glutamino sintetasa (fig 6).

La actividad de glutamato sintasa en Rhizobium phaseoli se ha reportado de 32 nanomoles de NADH oxidado

por minuto por miligramo de proteína en glutamina (34). En este trabajo se detecta una actividad de 27.1 en glutamina y 14.1 en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, esto demuestra que al no detectarse actividad de glutamino sintetasa II el amonio no es asimilado para resintetizar glutamina y por lo tanto la degradación de la glutamina por glutamato sintasa baja el 50% en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. La actividad de transaminasa de glutamina fue de 12.9 nanomoles de 2-oxoglutarato producido por minuto por miligramo de proteína en glutamina y de 11.7 en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono lo que indica que la glutamina puede ser utilizada como fuente de carbono en Rhizobium phaseoli (tabla 4).

La acumulación del 2-oxoglutarato in vivo en amonio más DON (tabla 3) demuestra que la glutamina forma un ciclo donde es degradada y resintetizada por la vía de la transaminasa de glutamina- α -amidasas, glutamato sintasa y glutamino sintetasa en Rhizobium phaseoli (fig 9).

CONCLUSIONES.

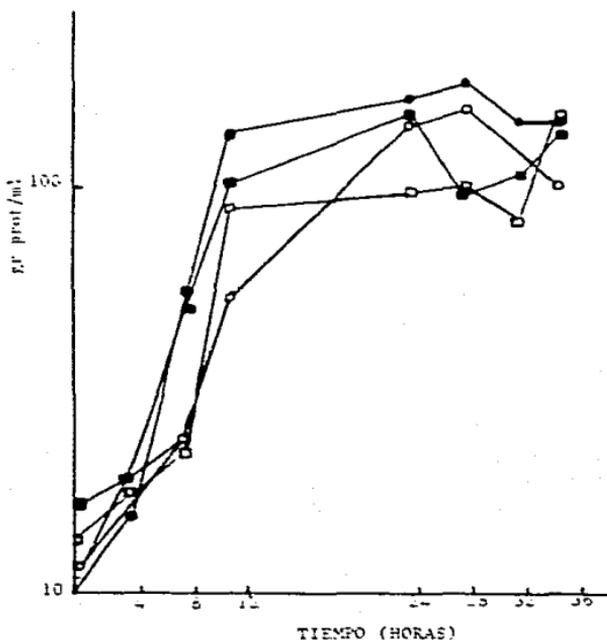
En el presente trabajo se demuestra la participación de la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa en la degradación de la glutamina.

La actividad enzimática de la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa, glutamato sintasa y glutamino sintetasa participan en la asimilación de la glutamina en donde la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa degrada la glutamina a amonio y 2-oxoglutarato, el 2-oxoglutarato es asimilado por la glutamato sintasa para degradar la glutamina a 2 moléculas de glutamato y el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa para sintetizar nuevamente glutamina a partir de glutamato. De tal forma que la presencia de estas enzimas contribuyen a la formación de un ciclo donde la glutamina es constantemente degradada y resintetizada.

FIGURA 1

CRECIMIENTO DE Rhizobium phaseoli EN DIFERENTE

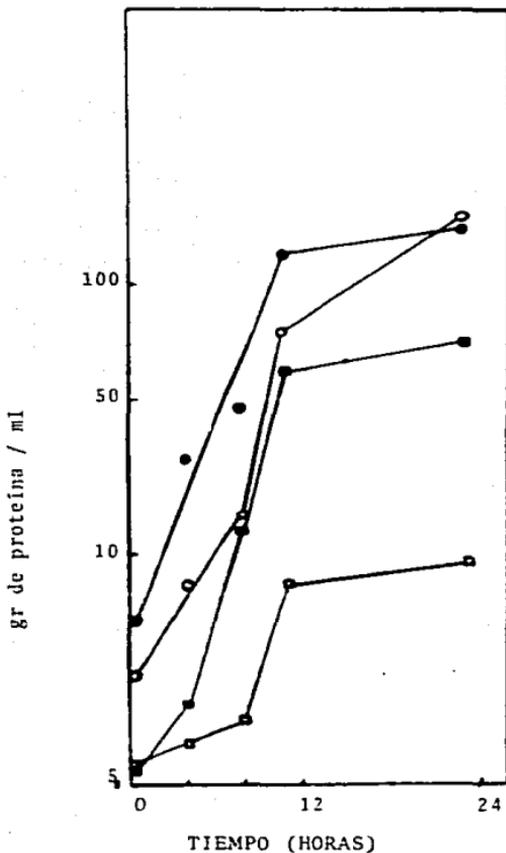
CONDICIONES



Determinación del crecimiento en diferentes medios:
Glutamina más Succínico (●), Glutamato y Succínico (■),
Glutamina como fuente de Nitrógeno y Carbono (○),
y Nitrato de Potasio más Succínico (□).

FIGURA 2

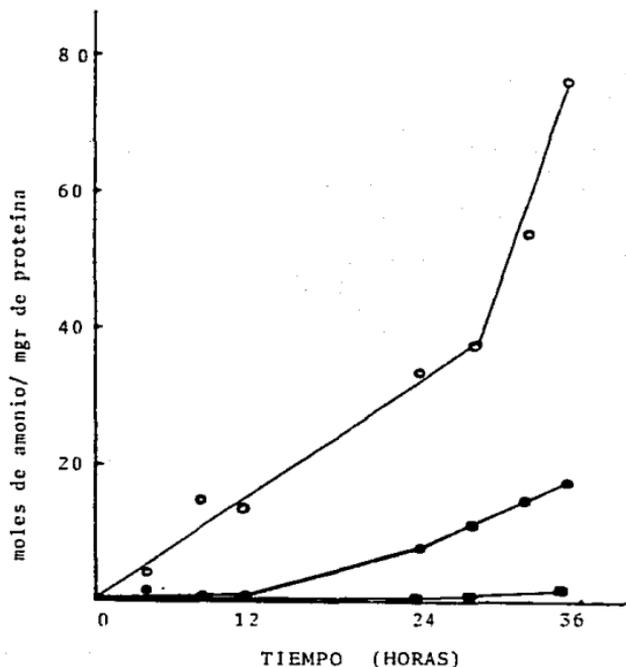
CRECIMIENTO DE Rhizobium phaseoli y Echerichia coli.



Células de Rhizobium phaseoli (●,○) y E coli (■,□),
crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina
más succinato (●,■) y con glutamina como fuente de
nitrógeno y carbono (○,□) durante 24 hrs.

FIGURA 3

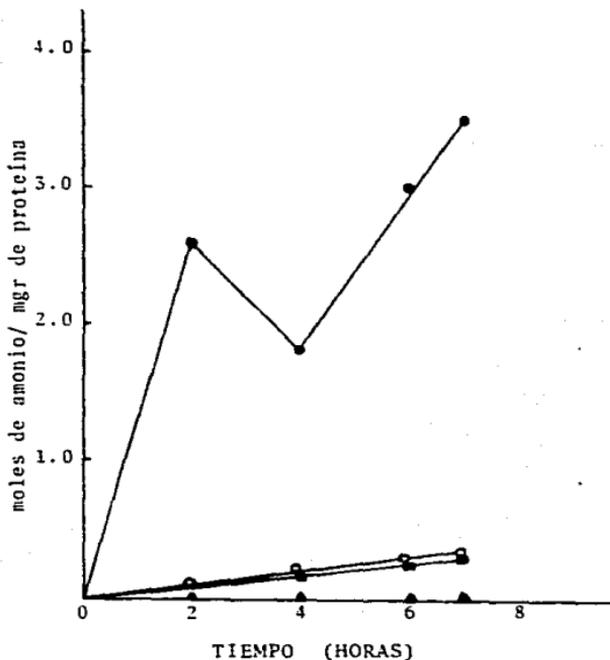
EXCRECIÓN DE AMONIO EN Rhizobium phaseoli EN DIFERENTES
CONDICIONES



Las células se crecen en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato (●), con glutamina como fuente de nitrógeno y carbono (○) y con nitrato de potasio más succinato (■) durante 36 hrs.

FIGURA 4

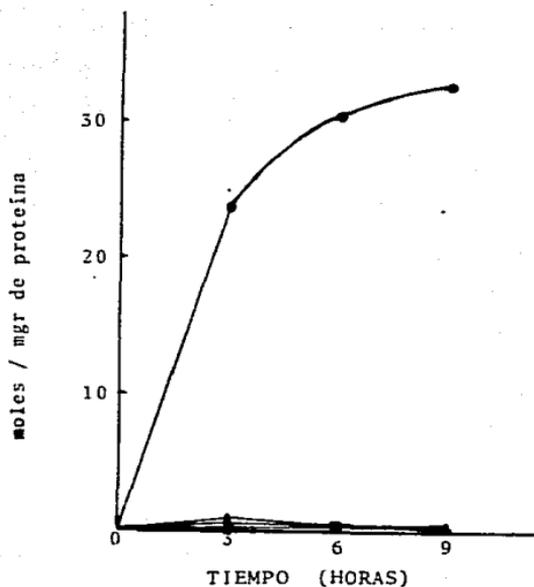
INHIBICION POR AMINOOXIACETICO Y DON DE LA EXCRECION DE AMONIO EN Rhizobium phaseoli.



Las células se crecen 12 hrs en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato. Las células se colectan y transfieren a los siguientes medios: glutamina más succinato (●), glutamina más amonooxiacético 10mM (■), glutamina más DON 1mM (○) y sin fuente de nitrógeno, y se incuban durante 7 hrs.

FIGURA 5

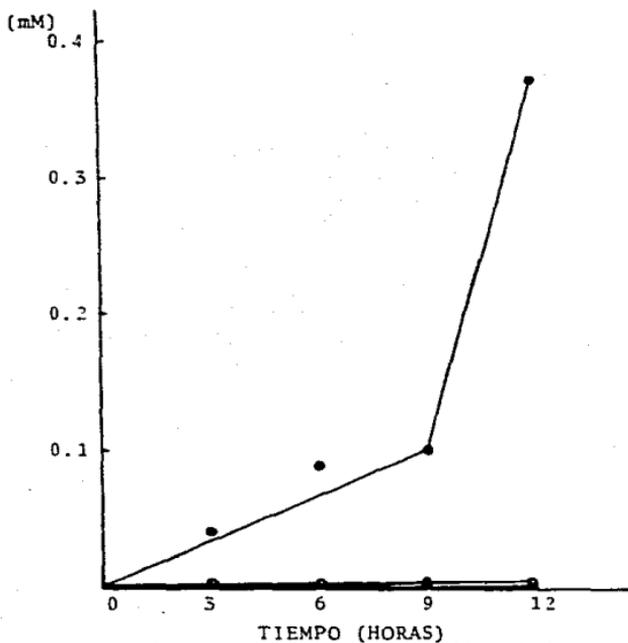
INHIBICION POR AMINOOXIACETICO Y DON DE LA EXCRECION DE
AMONIO EN Rhizobium phaseoli.



Las células se crecen 12 hrs en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Las células se colectan y transfieren a los siguientes medios: glutamina (●), glutamina más aminooxiacético 10mM (□), glutamina más DON 1mM (▲) y sin fuente de nitrógeno. Y se incuban durante 9 horas.

FIGURA 6

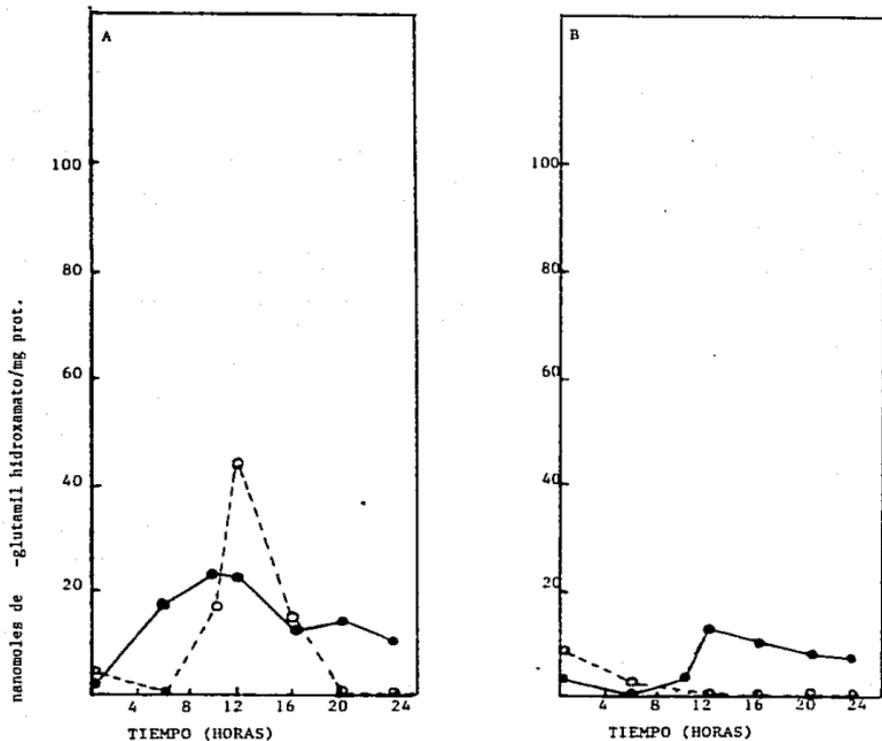
EXCRECION DE AMONIO EN Rhizobium phaseoli.



Las células se crecen en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato (O), glutamina más metionina sulfoximina 5mM (●) y metionina sulfoximina 5mM más succinato durante 12 hrs.

FIGURA 7

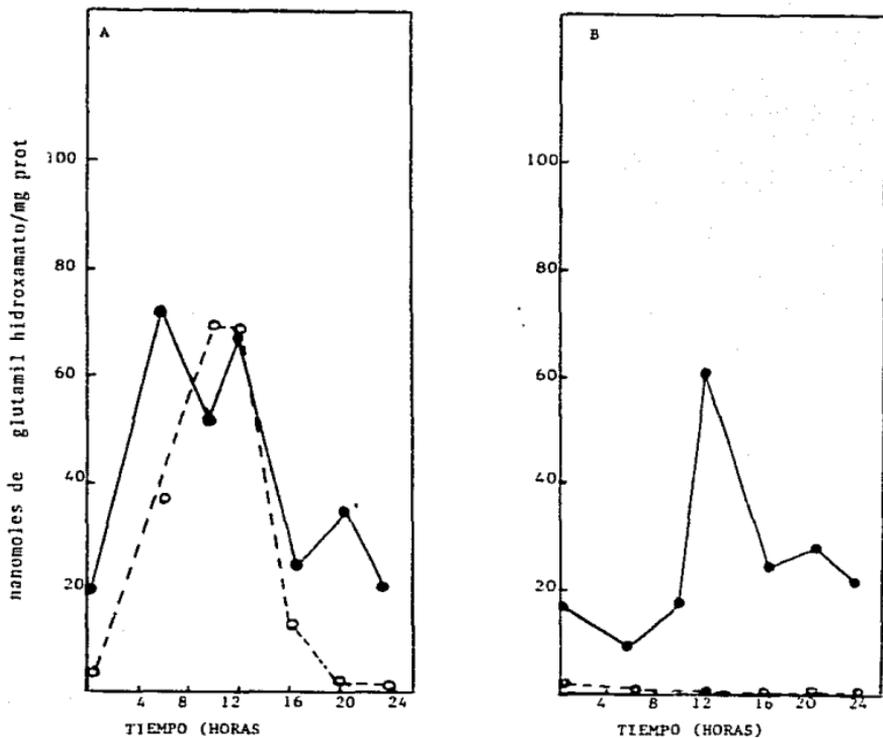
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTAMINO SINTETASA EN Rhizobium phaseoli.



Ensayo de sintetasa: A) Células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina 10mM más succínico 10mM. Actividad de GSI (●) y GSII (○). B) Células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Actividad de GSI (●) y GSII (○).

FIGURA 8

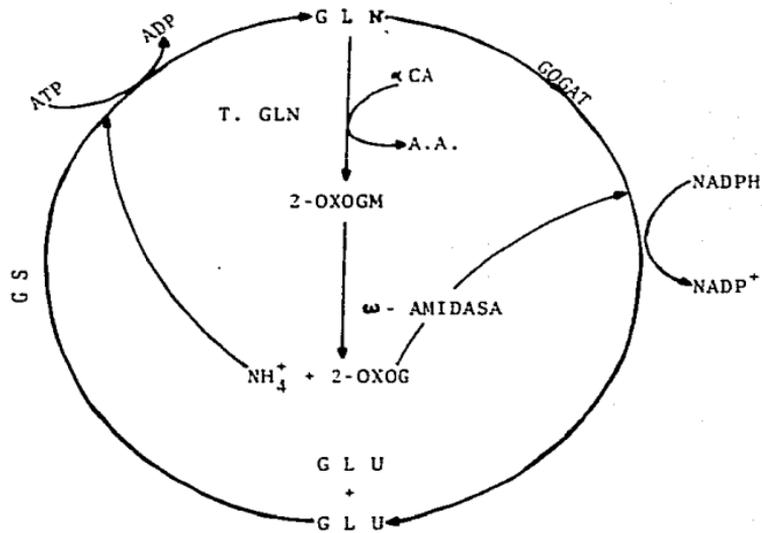
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUTAMINO SINTETASA EN Rhizobium phaseoli.



Ensayo de transferasa: A) Células crecidas en medio mínimo suplementado con Glutamina 10mM más Succínico. Actividad de GSI (●) y GSII (○). B) Células crecidas en medio mínimo suplementado con Glutamina 10mM como Fuente de Nitrógeno y Carbono. Actividad de GSI (●) y GSII (○).

FIGURA 9

CICLO DE LA GLUTAMINA EN Rhizobium phaseoli.



2-OXOGM. 2-oxoglutamato

2-OXOG. 2-oxoglutarato

GOGAT glutamato sintasa

G S glutamino sintetasa

T. GLN transaminasa de glutamina

TABLA 1

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRANSAMINASA DE GLUTAMINA

EN Rhizobium phaseoli.

ENSAYO ^A	ACTIVIDAD ESPECIFICA ^B
COMPLETO ^C	10.5
SIN GLUTAMINA	N.D. ^D
SIN GLIOXALATO	N.D.
CON AOA 10 mM	0.84
SIN DON	3.94

^A Los extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato a las 14hrs a 30 °C.

^B Expresado en nanomoles de 2-Oxoglutamato producido por minuto por miligramo de proteína.

^C Contiene (1ml) glutamina 20mM, DON 0.6mM, glioxalato 20mM, buffer borato 75mM (pH 8.5) y fosfato de piridoxal 0.2mM.

^D ND, No detectable.

AOA. aminooxicético.

TABLA 2

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRANSAMINASA DE GLUTAMINA- -AMIDASA

EN Rhizobium phaseoli.

ENSAYO ^A	ACTIVIDAD ESPECIFICA ^B
COMPLETO ^C	4.3
SIN GLUTAMINA	N.D ^D
SIN GLIOXALATO	N.D
CON AOA 10mM	N.D
CON DON 0.6mM	N.D

^A Los extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato a las 14 hrs a 30 °C.

^B Expresado en nanomoles de amonio producido por minuto por miligramo de proteína.

^C Contiene (1ml) gluamina 20mM, glioxalato 20mM, fosfato de piridoxal 0.2mM y buffer borato 75mM (pH 8.5).

^D ND, no detectado.

AOA. aminooxicético.

TABLA 3

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION 2-OXOGLUTARAMATO in vivoEN Rhizobium phaseoli.

ENSAYO ^A	CONCENTRACION ^B
GLUTAMINA MAS SUCCINATO	11.95
GLUTAMINA MAS DON	28.55
GLUTAMINA MAS DON MAS AOA	17.61
AMONIO MAS SUCCINATO	15.47
AMONIO MAS DON	29.73
AMONIO MAS DON MAS AOA	21.10

^ACélulas crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina ó amonio como fuente de nitrógeno y succinato como fuente de carbono por 12 hrs. Colectadas y transferidas a otros me dios con inhibidores enzimáticos e incubados durante 6 hrs

^BExpresado en nanomoles por miligramo de proteína.
AOA. aminoociacético.

TABLA 4

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTAMATO SINTASA Y TRANSAMINASA DE
GLUTAMINA EN Rhizobium phaseoli.

ENSAYO ^A	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
	GLUTAMATO SINTASA ^B	TRANSAMINASA DE GLUTAMINA ^C
GLN + SUCC	27.1	12.9
GLN	14.1	11.7

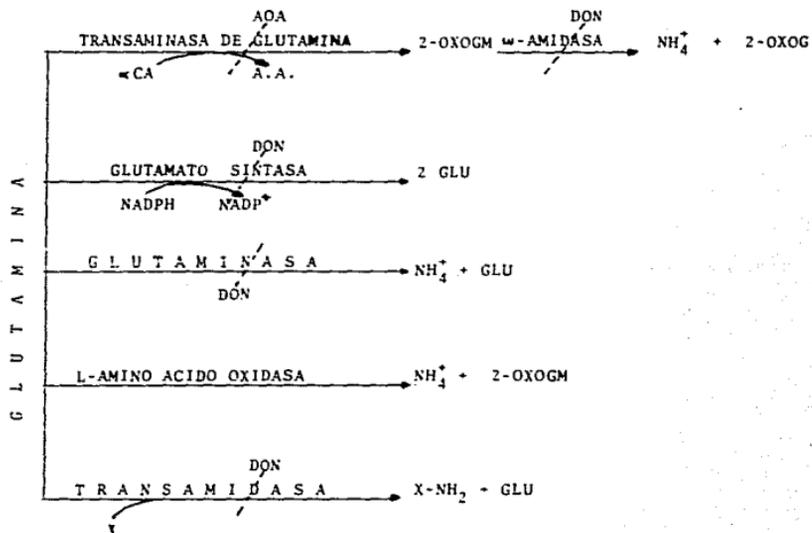
^A Los extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato (GLN+SUCC) y glutamina (GLN) como fuente de nitrógeno y carbono a las 14 hrs a 30 °C.

^B Expresada en nanomoles de NADH oxidado por minuto por miligramo de proteína.

^C Expresado en nanomoles de 2-oxoglutamato producido por minuto por miligramo de proteína.

TABLA 5

DEGRADACION DE LA GLUTAMINA POR DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.



BIBLIOGRAFIA.

1. Mora, J. and Lara, F. 1988. Nitrogen Metabolism: An overview. In Sánchez-Esquivel (ed) Nitrogen source control of microbial processes. p. 59-81.
2. Calderón, J. 1985. La asimilación de la glutamina en Neurospora crassa. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
3. Calderón, J. 1981. Estudio de la transaminasa de glutamina de Neurospora crassa. Tesis de Licenciatura. UNAM.
4. Powers, S.G. and Meister. A. 1978. J. Biol. Chem. 253: 800-807.
5. Meister, A. and Power, S. 1978. Adv. Enz. Reg. 16: 287-298.
6. Meister, A. 1980. Glutamine metabolism, Enzymology, and Regulation, J. Mora and R. Palacios Ed. Academic Press Inc. pp. 1-40.
7. Freese, E., Park, S. and Casbel, M. 1964. Proc. Nat. Acad. Sc. 51:1164-1168.
8. Tempest, D.W. Meers, J. and Brown, C. 1970. Biochem. J. 117: 407-411.
9. Hummelt, G. and Mora, J. 1980. Biochem. Biophys. Res. Comun. 96: 1688-1694.
10. Imada, A., Igarasi, Nakahama, K. and Isono, M. 1973. J. Gen. Microbiol. 76: 85-99
11. Thayer, S.P. and Horowitz, N.H. 1951. The L-amino

- acid oxidase of Neurospora. J. Biol. Chem. 192, 755.
12. Otey, M.C., Birnbaum, S.M. and Greenstein, J.P. 1954. Soubilized Kidney glutaminase I, Arch. Biochem. Biophys. 49,245.
13. Meister, A. and Tice, S.V. 1950. Transamination from glutamine to α -keto acids, J. Biol. Chem. 187, 173.
14. Cooper, A.J. and Meister, A. 1972. Isolation and properties of highly purified glutamine transaminase. Biochemistry. 11, 661.
15. Cooper, A.J. and Meister, A. 1977. The glutamine transaminase amidase pathway, C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry. 4, 281.
16. Meister, A. 1955. Glutaminase, asparaginase, and α -keto acid- -amidase. Methods Enzymol. 2, 380.
17. Monder, C. and Meister, A. 1958. α -keto glutaramic acid as a product of enzymatic transamination of glutamine in Neurospora. Biochem. Biophys. Acta, 28, 202.
18. Meister, A. 1953. Preparation and enzymatic reactions of the keto analogues of asparagine and glutamine. J. Biol. Chem. 200, 571.
19. Otami, T.T. and Meister. 1957. -amide and -amino acid derivatives of α -ketoglutaric and oxalacetic acids. J. Biol. Chem. 224, 137.
20. Hersh, L.B. 1971. Rat liver. -amidase. Purification and properties. Biochemistry. 10, 2284.

21. Cooper, A.J. and Meister, A. 1970. Glutamine transaminase, *Methods Enzymol.* 17, 1016.
22. Price, V.E., and Grenstein, J.P. 1945. Studies on the effect of pyruvate on the desamination of glutamine, asparagine, and related compounds. *J. Natl. Cancer Inst.* 7, 275.
23. Kupchick, H. and Knox, W. 1970. Phenylpyruvate-glutamine aminotransferasa (Rat kidney). *Methods Enzymol.* 17, 951.
24. Kupchick, H. and Knox, W. 1970. Assays of glutamine and its aminotransferase with the enol-borate of phenylpyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 178.
25. Cooper, A.J. and Meister, A. 1974. Isolation and properties of a new glutamine transaminase from rat kidney. *J. Biol. Chem.* 249, 2554.
26. Calderón, J., Morett, E. and Mora, J. 1985. The u-amidase pathway in the degradation of glutamine in Neurospora crassa. *J. Bacteriol.* 161: 807-809.
27. Lomnitz, A., Calderón, J., Hernández, G., and Mora, J. 1987. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in Neurospora crassa. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2333-2340.
28. Calderón, J. and Mora, J. 1985. Glutamine Cycling in Neurospora crassa. *J. Gen. Microbiol.* 131:3237-3242.
29. Calderón, J., Cooper, A.J.L., Gelbard, A.S., and

Mora, J. 1989. ^{13}N Isotope studies of glutamine assimilation pathway in Neurospora crassa. J. Bacteriol. (en prensa).

30. Calderón, J. and Mora, J. 1989. Glutamine assimilation as nitrogen and carbon source in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. (sometido).

31. Mora, J., Calderón, J. and Hernández, G. 1988. Search assimilation and Turnover of nitrogen in some fungi. In Sánchez-Esquivel (ed) Nitrogen source control of microbial processes. p.59-81

32. Hernández, G. and Mora, J. 1986. Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 132: 3315-3323.

33. Ali, and Niel. 1981. The pathways of Ammonia Assimilation in Rhizobium phaseoli. Arch Microbiol. 129: 391-394.

34. Bravo, A. and Mora, J. 1988. Ammonium Assimilation in Rhizobium phaseoli by the Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway. J. Bacteriol. 170:000-000.

35. O'Gara, F. Shanmugan, K. 1976. Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia, export of fixed N_2 as NH_4 . Biochem. Biophys. Acta. 437: 313-321.

36. Ronson, C. and Primrose, S. 1979. Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: Identification and symbiotic properties of mutants. J. Gen. Microbiol. 112: 77-88.

37. Urban, J. and Dazzo, F. 1982. Succinate induced mor-

phology of Rhizobium trifolii 0403 resembles that of bacteroids in clover nodules. App. Env. Microbiol. 44: 219-226.

38. Brown, C. and Dilworth, J. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86: 39-48.

39. Vairinhos, F. Bhandari, B. and Nicholas, D. 1983. Glutamine synthetase glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in Rhizobium japonicum strains grow in cultures and in bacteroids from root nodules of Glycine max. Planta. 159: 207-215.

40. O'Gara, F. and Shanmugam, K. 1976. Control of symbiotic nitrogen fixation in Rhizobia, regulation of NH_4 assimilation. Biochem. Biophys. Acta. 451: 342-352.

41. Ali, H. Niel, C. and Guillaume, J. 1981. The pathways of ammonia assimilation in Rhizobium meliloti. Arch. Microbiol. 129: 391-394.

42. Darrow, R. 1980. Role glutamine synthetase in nitrogen fixation. Glutamine metabolism, enzymology and regulation. Academic Press. 139-163.

43. Bravo, Becerril, and Mora. 1988. Introduction of the Escherichia coli gdhA Gene into Rhizobium phaseoli: Effect on Nitrogen Fixation. Journal of Bacteriology. 170: 985-988.

44. Soberon, M. 1986. Asimilación de glutamina en Saccharomyces cerevisiae. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM.