



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Postgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

LA REGULACION DEL METABOLISMO NITROGENADO EN UNA MUTANTE
DE Escherichia coli K-12 CARENTE DE CITRATO SINTASA.

T E S I S

Que para obtener el título de
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a

MARTA NOLL-LOUZADA

México, D.F., 1992.

TESIS CON
SALA DE ORIGEN

7
2ej



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.

I N D I C E

| | |
|---|----|
| I. ABREVIATURAS | 3 |
| II. INTRODUCCION | 5 |
| III. ANTECEDENTES | 14 |
| IV. OBJETIVO | 16 |
| V. HIPOTESIS | 17 |
| VI. MATERIAL Y METODOS | 18 |
| 1. Cepas Bacterianas | 18 |
| 2. Reactivos | 19 |
| 3. Condiciones de Cultivo | 19 |
| 4. Preparación de Lisados de P ₁ <u>virA</u> | 21 |
| 5. Titulación de P ₁ <u>virA</u> | 22 |
| 6. Transducción con P ₁ <u>virA</u> | 22 |
| 7. Determinación de la Actividad Enzimática de Glutamino Sintetasa (GS) | 23 |
| 8. Determinación de Proteína por el Método de Lowry | 25 |
| 9. Conjugación | 27 |
| 10. Determinación de Actividad de Citrato Sintasa | 27 |
| 11. Pozas de α -cetoglutarato | 29 |
| 12. Pozas de Aminoácidos | 31 |

| | |
|--|----|
| VII. RESULTADOS | 36 |
| 1. Actividad de Citrato Sintasa | 36 |
| 2. Crecimiento de MX1150 y MX1152 en función del suministro de nitrógeno y carbono | 36 |
| 3. Regulación de Glutamino Sintetasa | 39 |
| 4. Pozas de α -cetoglutarato, glutamina y glutamato | 40 |
| VIII. DISCUSION | 53 |
| IX. BIBLIOGRAFIA | 63 |

ABREVIATURAS

A.E. = Actividad específica
BSA = Albúmina bovina sérica
CTAB = Bromuro de cetil trimetilamonio
d = Daltones
D.O. = Densidad óptica
EDTA = Etilendinitrilotetracetato disódico
°C = Grados Centígrados
g = Gramos
TRIS = Hidroximetil amino metano
h = Horas
l = litro
µg = Microgramos
µl = Microlitro
mg = Miligramo
ml = Mililitro
mm = Milímetros
mM = Milimolar
min = Minuto
M = Molar
ng = Nanogramos
nm = Nanómetros
α-KG = α -cetoglutarato
gln = Glutamina
rpm = Revoluciones por minuto
ufp = Unidades formadoras de placa

μm = micrómetros

cm = centímetros

u.k. = unidades Klett

NADP = (beta-Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
oxidado)

NADPH = (beta-Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
reducido)

. INTRODUCCION

Las enterobacterias son capaces de crecer en medio mínimo, conteniendo un solo componente de una gran variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía, y uno de una variedad más limitada de compuestos orgánicos o inorgánicos como única fuente de nitrógeno. La mayoría de los organismos vivos es incapaz de asimilar el nitrógeno molecular, que se encuentra en la atmósfera, y requieren que el nitrógeno se encuentre en forma de compuestos inorgánicos simples como amonio, nitritos, nitratos, o también como moléculas orgánicas más complejas como algunos aminoácidos (prolina, histidina, aspartato, arginina, etc.). Aunque las fuentes preferenciales de nitrógeno y carbono son el amonio y la glucosa, respectivamente.

El crecimiento en otras fuentes nitrogenadas que no sea el amonio es más lento. A este crecimiento se le llama: limitación de nitrógeno. Y a los sistemas que se inducen en esta condición se les denomina Ntr.

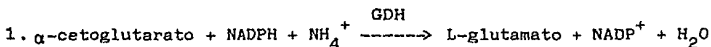
El sistema Ntr involucra la síntesis de las enzimas que son capaces de degradar estas fuentes nitrogenadas, así como los sistemas de transporte para estas fuentes (36).

Los caminos de asimilación de amonio son bastante limitados.

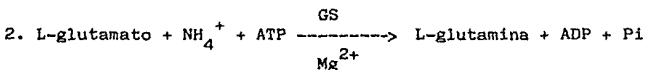
De todos los aminoácidos encontrados en proteínas y otros constituyentes celulares, el amonio puede ser asimilado directamente en solo algunos. Existen dos intermediarios celulares muy importantes para la biosíntesis de compuestos nitrogenados, como aminoácidos, nucleótidos, y otros, que son el glutamato y la glutamina, y además son los principales donadores de su grupo amino y amido, respectivamente.

Escherichia coli y otras enterobacterias son capaces de crecer en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno. Para la asimilación del amonio dos enzimas son muy importantes:

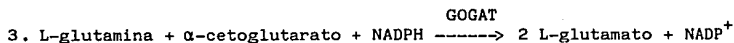
a. La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), (EC 1.4.1.4), que sintetiza glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, concomitante con la oxidación de una molécula de NADPH, como se muestra en la siguiente reacción:



b. La enzima glutamino sintetasa (GS), (EC 6.3.1.2), que utiliza amonio y glutamato para sintetizar glutamina.



Además de estas dos enzimas, existe otra enzima importante que es la glutamato sintasa (GOGAT), (EC 1.4.1.13), que involucra la transferencia del grupo amino de la glutamina al carbono α del α -cetoglutarato, resultando en la producción de dos moléculas de glutamato. La reacción es la siguiente:



A pesar de la gran importancia que tienen las enzimas biosintéticas de glutamato y glutamina en la asimilación y metabolismo del nitrógeno, hay poca información todavía respecto a su regulación. La mayor parte de los estudios fisiológicos y genéticos se han centrado en los mecanismos regulatorios de la síntesis de glutamina, los cuales constituyen un sistema muy complejo.

La GS es la única enzima capaz de sintetizar glutamina por lo que cepas mutantes que carecen de esta actividad son auxótrofas de éste aminoácido (28, 36). La GS es una proteína de unos 600,000 d de peso molecular, compuesta por doce subunidades iguales que tienen un peso molecular de aproximadamente 50,000 d cada una. Tanto la actividad enzimática como la síntesis de la GS están sujetas a un control muy riguroso. Un primer mecanismo de control sobre la actividad enzimática está dado por la inhibición

acumulativa de algunos productos del metabolismo de la glutamina (14,42). Se ha descrito también una regulación de la actividad que consiste en un cambio conformacional de la proteína, lo cual depende de la ausencia o presencia de algunos cationes divalentes, de tal manera que en ausencia de estos, la enzima adquiere una conformación "relajada", la cual es catalíticamente inactiva. Cuando se agregan los cationes, la enzima se reactiva y regresa a su conformación activa (14). El tercer mecanismo de regulación de la actividad enzimática de GS, y quizás el más conspicuo, consiste en la adenilación reversible de un grupo tirosilo de cada subunidad de la GS. Este mecanismo responde a la disponibilidad de nitrógeno en el medio, y la enzima va perdiendo actividad a medida que aumenta su grado de adenilación, \bar{n} (14, 39, 42, 43). Tanto la reacción de adenilación como la de desadenilación, las cataliza una misma enzima denominada adeniltransferasa (ATasa), la cual a su vez está regulada por una pequeña proteína conocida como P_{II} . Esta proteína puede existir como dos formas interconvertibles: P_{IIA} y P_{IID} . La primera estimula la ATasa para catalizar la reacción de adenilación de la GS, mientras que la P_{IID} estimula la desadenilación. La interconversión de P_{IIA} a P_{IID} depende de la actividad de una uridiltransferasa (UTasa) que une reversiblemente un grupo UMP a la proteína P_{IIA} . La UTasa aparentemente también es

capaz de deuridilar a P_{IID} para convertirla en la forma P_{IIA} . La actividad de la UTasa se afecta por las altas concentraciones de α -cetoglutarato y ATP, que estimulan la uridilación de P_{II} para formar la P_{IID} , que a su vez estimula la desadenilación de la GS, lo cual resulta en mayor actividad biosintética de esta enzima y por lo tanto, mayor síntesis de glutamina. La reacción de uridilación de la P_{II} se inhibe por glutamina y fosfato inorgánico, lo que resulta en la forma P_{IIA} de esta proteína, y por lo tanto se estimula la adenilación de GS. La ATasa también responde a los niveles de ATP, α -cetoglutarato y glutamina, de manera que altas concentraciones de glutamina y bajas de α -cetoglutarato estimulan la adenilación; bajos niveles de glutamina y altos de α -cetoglutarato y ATP estimulan la desadenilación. Se ha demostrado que el grado de adenilación de la GS es muy sensible a concentraciones intracelulares de α -cetoglutarato y glutamina, y pequeños cambios en la relación de la concentración de α -cetoglutarato (α -KG) a glutamina (gln) causa cambios dramáticos en la adenilación de la GS (37,41).

Todas estas reacciones integran un sistema cerrado de una Cascada Bicíclica, la cual hace con que las células tengan una sensibilidad aumentada a pequeños cambios en concentraciones de los efectores (la glutamina y el α -cetoglutarato), y también ajusta rápidamente el estado de adenilación-desadenilación de la glutamino

sintetasa, y en consecuencia, su actividad biosintética.

La relación intracelular L-glutamina/ α -cetoglutarato sufre pequeñas variaciones como consecuencia de la abundancia o escasez de nitrógeno accesible a E.coli. Si se crecen estas bacterias en medio mínimo con glucosa y exceso de NH_4^+ (mayor que 1mM) resulta en una relación alta entre glutamina y α -cetoglutarato. El porque la relación favorece a la poza de glutamina sobre la de α -cetoglutarato no ha sido dilucidado, pero la posibilidad de que sea por la sobresíntesis de glutamina es difícil de ser cierta, dado que en condiciones de exceso de NH_4^+ , la enzima glutamino sintetasa (GS) se sintetiza en poca cantidad y se encuentra casi completamente adenilada, esto es, biosintéticamente inactiva. En condiciones de crecimiento en medio mínimo con glucosa y en limitación de nitrógeno (0.5 mM NH_4^+ , arginina, prolina ó glutamina), E.coli incrementa como diez veces la síntesis de glutamino sintetasa, comparada con la cantidad de ésta enzima en células crecidas en condiciones de exceso de nitrógeno. Además, en condiciones de limitación de nitrógeno, la GS se encuentra desadenilada, o sea, biosintéticamente activa. Esto sugiere que bajo limitación de nitrógeno, las células deben tener baja la relación intracelular glutamina/ α -cetoglutarato. Además, en estas condiciones fisiológicas el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa y no por la glutamato deshidrogenasa (22),

debido a su alta K_m por NH_4^+ (38). Como consecuencia, en condiciones de limitación de nitrógeno, el glutamato se hace preferentemente por la enzima glutamato sintasa.

La escasez de amonio intracelular, probablemente, pueda explicar las bajas velocidades de crecimiento de enterobacterias en casi todos los compuestos nitrogenados limitantes. La excepción es la glutamina, para la cual no hay explicación bioquímica por ser una excelente fuente nitrogenada, aunque limitante.

La cascada bicíclica no resultaría tan eficiente por si sola si la cantidad de glutamino sintetasa sintetizada por las células no fuese regulada por el nitrógeno disponible, o sea, la respuesta Ntr. La expresión de glnA, el gene estructural de glutamino sintetasa, y algunos otros genes involucrados en la asimilación de nitrógeno, son regulados transcripcionalmente por los productos de glnL y glnG. Estos dos genes y glnA forman el operón glnALG (36). La transcripción de glnA ocurre a partir de promotores en tandem, glnAp1 y glnAp2, los cuales son reprimido y activado, respectivamente, por la proteína NR_I , el producto de glnG. La activación mediada por NR_I requiere RNA polimerasa y σ^{54} , el producto rpoN. Bajo limitación de nitrógeno, se inducen altos niveles de transcripción a partir de glnAp2 por la acción de NR_I -P con RNA polimerasa y σ^{54} (17,35). El producto

de glnL (NR_{II}) es una proteína quinasa-fosfatasa, la cual se auto-fosforila y además, fosforila y desfosforila NR_I (31). Bajo condiciones de exceso de NH_4^+ , se transcriben niveles basales de mensajeros a partir de glnAp1, con RNA polimerasa y σ^{70} .

Los mecanismos bioquímicos conocidos para detectar la limitación de nitrógeno en el medio ambiente, las fluctuaciones en la relación gln/α -KG, y la transmisión de señales y la fosforilación de NR_I que es la responsable de la respuesta Ntr, son incipientes. Se ha demostrado que en Klebsiella aerogenes, mutantes en glnD (10), y en glnB (11), las cuales contienen mutaciones puntuales, son incapaces de sintetizar uridiltransferasa y producen una proteína P_{II} alterada, respectivamente. Ambas cepas son auxótrofas de glutamina, dado que son incapaces de convertir P_{II} en P_{II} -UMP. Por otra parte, se ha visto que su auxotrofia puede ser suprimida por mutaciones en glnL, por lo que se ha hipotetizado que P_{II} reprime la expresión de glutamino sintetasa por interacción de NR_{II} (5,28). Evidencias adicionales demuestran que cepas de E.coli y Klebsiella pneumoniae que poseen mutaciones que nulifican completamente glnL (2,5) y glnB (19), tienen una regulación nitrogenada normal. Además, se ha encontrado que la proteína P_{II} es necesaria para una rápida desfosforilación de NR_I , pero no tiene efecto

sobre la auto-fosforilación de NR_{II} (21). Así, estos resultados sugieren que P_{II} y NR_{II} no deben ser las únicas señales transmitidas a NR_I . Otras posibles alternativas podrían ser reacciones análogas de fosfotransferencia como las catalizadas por los productos de cheA y envZ, los cuales, se ha demostrado in vitro que fosforilan a NR_I (20,32). Más recientemente, ha sido descubierta una proteína asociada a membrana que es metilada en E.coli en condiciones de privación de nitrógeno, carbono o fosfato, y posiblemente podría ser la señal inicial para estos procesos (46).

ANTECEDENTES

No hay que perder de vista que las predicciones acerca de las propiedades de la cascada bicíclica solo han sido probadas parcialmente in vitro con proteínas purificadas y células intactas permeabilizadas con detergente (37). Estudios in vivo acerca de la relación intracelular $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$ bajo diferentes fuentes nitrogenadas, no han sido reportados. Excepto en el trabajo de Senior (39), en donde demostró que el crecimiento de células de E.coli W, en medio mínimo con glucosa y exceso de amonio, la relación intracelular $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$ era inversamente proporcional a la cantidad de glutamino sintetasa no adenilada.

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer si era posible alterar la relación intracelular $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$ en células de E.coli K-12, y si fuera posible cual sería su efecto sobre el metabolismo nitrogenado. Hay un ejemplo en el cual este tipo de alteración parece haber ocurrido. En ciertas mutantes glnE en Salmonella typhimurium, las cuales perdieron la actividad de adeniltransferasa, crecen muy lentamente bajo todas las condiciones de cultivo, en consecuencia de su alto nivel constitutivo de glutamino sintetasa, y además completamente no adenilada. Cuando se hace un cambio de un medio de limitación de nitrógeno, a uno con exceso de nitrógeno, hay una

sobresíntesis de glutamina a expensas de la poza de glutamato (24). Aunque los autores no reporten las pozas de α -cetoglutarato, se podría asumir que la relación $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$ es siempre elevada. La determinación de estos efectores intracelulares es imposible de llevarse a cabo en mutantes defectivas en la respuesta Ntr, como glnG o rpoN, por su incapacidad de crecer o de crecer pobremente en fuentes limitantes de nitrógeno; logran crecer en glutamina, pero en estas mutantes la respuesta Ntr no se presenta.

La mutación gltA que afecta la actividad de la enzima citrato sintasa, provoca una auxotrofia por glutamato en E.coli (13). Dicha enzima sintetiza citrato a partir de acetil-CoA y oxaloacetato en el ciclo de Krebs (fig. 10). El gene que codifica para esta enzima se encuentra en el minuto 16.5 del mapa cromosómico de E.coli (1). Así pues, es razonable predecir que el glutamato adicionado externamente, para satisfacer la auxotrofia de las células gltA, debe servir también para sintetizar intermediarios, como probablemente α -cetoglutarato, para así alimentar el ciclo de Krebs. Si esto ocurre como parece ser el caso, no debe ser por una glutamato deshidrogenasa (GDH) catabólica, la cual se encuentra ausente en cepas silvestres de E.coli (44,45).

OBJETIVO

Determinar in vivo los efectos en el metabolismo nitrogenado en células de Escherichia coli K-12, con una mutación que afecta la actividad de citrato sintasa.

HIPOTESIS

Quisimos determinar los efectos en el metabolismo nitrogenado, en células de E.coli, con una mutación que afecta la actividad de citrato sintasa. Hipotetizamos que bloqueando irreversiblemente la síntesis de citrato y, en consecuencia, la de α -cetoglutarato, por el ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs, sería posible disminuir la poza intracelular de α -cetoglutarato, así como, modificar la relación intracelular $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$. Mutaciones que suprimen la actividad de citrato sintasa se esperaría que fueran letales en una cepa anaeróbica facultativa como E.coli, en ambas condiciones, aeróbica y anaeróbica (33). Esto podría suceder, a menos que uno de los intermediarios del ciclo de Krebs o compuestos metabolizables por el ciclo fueran suministrados en suficiente cantidad al medio y, además, transportados adecuadamente al interior de las células.

MATERIAL Y METODOS

1. Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas son derivadas de Escherichia coli K-12, MX614. Los lisados de P₁ virA fueron hechos de la cepa MX1146, una derivada gal⁺ de la cepa gal-7 W620 (34). Las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran en la Tabla 1.

Los lisados provenientes de MX1146, fueron utilizados para transducir Gal⁺ a la cepa MX614 (F⁻ Δ (lac-pro) ilv-680 thi-1 galE), ya que los genes galE y galK se encuentran en el minuto 17 y el gene gltA en el 16.5 (1). Se purificó una transductante que cotransdujo gltA6 (16), y se denominó MX1148. Como control en experimentos paralelos se utilizó la cepa MX614 (galE gltA⁺). Cultivos de MX1148, siempre lograban crecer en medio mínimo con glucosa y 15 mM NH₄⁺, probablemente por la formación de glutamato a partir de los 100 μ g/ml de prolina que se incluía al medio como requerimiento (12). Este crecimiento limitante favorecía también la aparición de cepas revertantes protótrofas de glutamato (Glt⁺). Por esta razón, reemplazamos la delección (lac-pro) por la región cromosomal silvestre correspondiente en ambas cepas, MX614 y MX1148. Se llevaron a cabo conjugaciones utilizando una cepa Hfr, JC158 (glyA) (6), como donadora y las

cepas MX614 y MX1148 como receptoras. Se seleccionaron recombinantes Pro^+ Lac^+ (Gly^+), y se nombraron MX1150 (galE gltA⁺) y MX1152 (gal⁺ gltA6).

Mutaciones en el gene gltA imponen a las células un requerimiento que es satisfecho por L-glutamato o α -cetoglutarato (13), o por L-prolina (12), y una incapacidad para utilizar acetato como fuente de carbono (13). Además, en medio mínimo con 0.2% de glucosa y 15 mM NH_4^+ , o con 0.4% de acetato de sodio y 6.8 mM de glutamina, como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, MX1150 es capaz de crecer, pero MX1152 es incapaz de hacerlo.

2. Reactivos

Todas las sustancias fueron de grado reactivo, obtenidas de las casas comerciales: Difco Lab., Baker, Sigma Co., Merck.

3. Condiciones de Cultivo

Se mantuvieron las cepas en tubos de agar inclinado con medio de Luria, los cuales fueron resebrados a intervalos de un mes.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Luria (30) que contiene 1% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio.
- Medio de LC: medio de Luria, más 25 mM de cloruro de calcio con 0.6% de agar.
- Medio de LCTG: medio sólido de Luria, adicionado de 25 mM de cloruro de calcio, 25 $\mu\text{g/ml}$ de timina y glucosa, a la concentración final de 0.2%.

La timina se esteriliza por filtración y la glucosa por autoclave, durante 20 min, a 15 lb, 121°C.

Se agrega la timina y la glucosa después de esterilizar el medio en autoclave, y cuando el medio alcance una temperatura de aproximadamente 50°C.

- Medio Mínimo NN (8): contiene fosfato monobásico de potasio 13.6 g/l, sulfato de potasio 2.61 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 g/l, cloruro de calcio 0.01 g/l, sulfato ferroso heptahidratado 0.05 mg/l. El pH final debe ser de 7.4, se lleva con KOH.

Se esteriliza en la autoclave 20 min, a 15 lb y 121°C. Como fuentes de carbono se añadió al medio glucosa al 0.2% (concentración final) ó gluconato de sodio al 0.2% (concentración final).

Como fuentes de nitrógeno se usaron a concentraciones finales: cloruro de amonio 15 mM (amonio en exceso), cloruro de amonio 0.5 mM (limitación de amonio), glutamina 1 mg/ml (6.8 mM) ó glutamato 0.2% (12 mM).

Cuando se usó glutamato como requerimiento, se utilizó a la concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.12 mM). La glutamina y el glutamato fueron esterilizados por filtración (30).

Para los cultivos en medios sólidos, se utilizaron los mismos medios, adicionándose 15 g/l de agar.

Cultivos de MX1150 y MX1152 fueron suplementados con L-isoleucina y L-valina, con una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ de cada aminoácido, y tiamina (0.2 $\mu\text{g/ml}$). Prolina (100 $\mu\text{g/ml}$), citosina (42.5 $\mu\text{g/ml}$).

Para realizar las curvas de crecimiento, se incubaron 10 mililitros de cultivo de MX1150 y MX1152 en matraces Erlenmeyer de 125 ml, inoculados con 10^7 células en baños giratorios a 37°C. Se diluyeron 1:40 en 10 ml del mismo medio en matraces similares, pero con brazo lateral. Se incubaron como se mencionó arriba hasta alcanzar ~80 unidades Klett (filtro rojo No. 66). Este proceso se repitió tres veces, y las densidades obtenidas en el último pase, sirvieron para calcular los tiempos de generación. Muestras recojidas periódicamente de cultivos de MX1152, fueron diluidas en medio mínimo con glucosa y 15 mM NH_4^+ . En glucosa-glutamato ó glucosa-glutamina, la frecuencia de reversión fue entre 2×10^{-7} y 2×10^{-6} , consecuentemente, estas bajas frecuencias no obscurecen los resultados en ninguno de los parámetros medidos.

4. Preparación de Lisados de P₁ virA

Para la preparación del fago en la cepa donadora, se cultivo ésta en medio de Luria hasta alcanzar la fase exponencial (40 unidades Klett, u.k.). Se tomó 0.5 ml del cultivo y se mezcló con 0.1 ml de bacteriófagos diluidos

a 1×10^{-7} ufp/ml en medio Luria.

Esta mezcla fue transferida a tubos con 3 ml de LC. Después de mezclarla bien con el agar suave, se vació en cajas de Petri con medio sólido de LCTG. Se dejó incubando por aproximadamente 12 horas a 37°C. Luego, se raspó el agar suave con espátula y se agregó 3 ml de Luria poniendo esta mezcla en tubos. Se añadió un volumen de cloroformo en la proporción de 1:20 y se agitó vigorosamente en vortex. Después se centrifugó a 5,000 rpm y el sobrenadante se recuperó, y se añadió nuevamente cloroformo y volvió a centrifugar. Se guardaron los bacteriófagos a 4°C.

5. Titulación de P₁ virA

Los lisados se titularon infectando a la cepa sensible AB1157, cultivada en medio de Luria y recuperada en 0.01 M de sulfato de magnesio y 0.005 M de cloruro de calcio. Se mezclaron 0.1 ml de la suspensión celular con diferentes diluciones del fago P₁, después de 20 min de incubación a 37°C, sin agitación, se vaciaron sobre cajas de LCTG con agar suave LC. Se incubaron 12 h a 37°C, y después se contaron las placas para determinar el título.

6. Transducción con P₁ virA

Una vez propagado y titulado el P₁ virA en la cepa donadora,

se cultivó la cepa receptora en medio de Luria, hasta 40 u.k.. Se centrifugó y se concentró diez veces en medio de Luria. Posteriormente, se separó en dos tubos cada uno con 0.5 ml de suspensión de bacterias. Se añadió 0.5 ml a cada tubo de una solución de cloruro de calcio 0.05 M y sulfato de magnesio 0.02 M, al tubo de la transducción se le añadió 0.1 ml de P_1 propagado en la cepa donadora adecuada, diluido 1×10^{-7} ufp/ml. Al control se le añadió 0.1 ml de medio de Luria. Después de incubarlo a 37°C durante 20 min, sin agitación, se centrifugó y las células fueron lavadas dos veces con NN. Estas se resuspendieron en 0.1 ml de NN y se plaquearon en cajas de medio selectivo.

7. Determinación de la Actividad Enzimática de Glutamino Sintetasa (GS). Descrito por Bender y col.(3) y modificado por Covarrubias y col.(8).

Se midió la actividad total de la enzima mediante el ensayo de γ -glutamil transferasa. Este ensayo mide la transferencia de γ -glutamil hidroxamato. Midiendo así la actividad total independiente del estado de adenilación de la enzima. La presencia de 60 mM Mg^{2+} en el ensayo inhibe completamente la actividad de las subunidades adeniladas, por lo que el grado de adenilación está dado por $\bar{n} = 12 - 12 \frac{b}{a}$, donde a es la actividad total de transferasa ($-Mg^{2+}$), y b es la actividad de subunidades

no adeniladas (+Mg²⁺).

Los extractos se prepararon creciendo 10 ml de cultivo en medio NN con las fuentes de nitrógeno adecuadas, hasta alcanzar un crecimiento de 80 u.k., inmediatamente se añadió 1 ml de CTAB a una concentración de 1 mg/ml, se agitó durante 3 min en las mismas condiciones de crecimiento. Se enfrió inmediatamente en hielo, se centrifugaron las células a 4°C. Posteriormente, se lavaron una vez con cloruro de potasio al 1%, se recentrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de cloruro de potasio 1%, manteniendo el extracto en hielo hasta el momento de la determinación de la actividad enzimática.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma:

| | |
|-------------------------|-----------|
| Agua | 3.5 ml |
| Imidazol 1M pH 7.33 | 1.125 ml |
| NH ₂ OH 0.8M | 0.185 ml |
| MnCl ₂ 0.1M | 0.0225 ml |
| Arseniato de sodio | |
| 0.25 M pH 7.33 | 0.75 ml |
| ADP sódico 20 mM pH 7.0 | 0.150 ml |
| CTAB 1 mg/ml | 0.75 ml |
| L-glutamina 0.2 M | 1.0315 ml |

Se ajustó el pH a 7.33 con hidróxido de sodio, después se aforó a 8.25 ml, se incubaron las muestras en un baño

a 37°C; se colocaron tres tubos de vidrio de 13 x 100 por extracto, a todos los tubos se les puso 0.4 ml de la mezcla de reacción. Al primer tubo se le añadió 1 ml de reactivo para detener la reacción, y luego se agregó 0.1 ml del extracto a cada uno de los tubos. El segundo y el tercero, fueron incubados con el extracto por 5 y 10 minutos, respectivamente, antes de detener la reacción. Para calcular el número de subunidades adeniladas (\bar{n}), es necesario hacer el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero añadiendo 0.165ml de $MgCl_2$ 3 M a la mezcla de reacción.

El reactivo para detener la reacción contiene 55 g/l de cloruro férrico hexahidratado, 20 g/l de tricloroacético y 21 ml/l de ácido clorhídrico. Los tubos se centrifugaron y se determinó la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a 540 nm. El factor de conversión utilizado fue 0.532, que es la absorbancia de 1 μ mol de γ -glutamil hidroxamato. Las actividades específicas se reportaron como μ moles de γ -glutamil hidroxamato producidos por minuto y por miligramo de proteína.

8. Determinación de proteína por el Método de Lowry (27).

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución A, para 1 litro:

NaOH 4 g

Na_2CO_3 20 g

- Solución B, para 100 ml:

Tartrato de sodio y potasio 2 g

- Solución C, para 100 ml:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1 g

- Solución de BSA, 1 mg/ml, se separa en alícuotas y se guarda a -20°C .

- Solución mezcla:

Solución A 98.0 ml

Solución B 1.0 ml

Solución C 1.0 ml

100.0 ml

- Solución Folín:

Una dilución 1:3, en agua.

a. Blanco: 1 ml de agua destilada.

Referencia: 100 μl de BSA y 900 μl de agua destilada.

Muestra: 100 μl de extracto y 900 μl de agua destilada.

b. Se agrega 5 ml de la solución mezcla, se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 min.

c. Se agrega 500 μ l de la solución de folín, se agita vigorosamente y se deja reposar por 30 min.

d. Se determina la cantidad de proteína, leyendo a 625 nm en el espectrofotómetro.

9. Conjugación

Se cultiva tanto la cepa donadora (Hfr), como la receptora (F^-) en 10 ml de medio Luria, hasta que alcancen 40 u.k.

Se mezclan ambas cepas a una proporción de 1 (Hfr) : 9 (F^-). Al tiempo cero, se agita la mezcla e inmediatamente se toma 0.1 ml y se agrega a 3 ml de agar suave. Se vuelve a agitar vigorosamente por 30 seg y se vacía a cajas de Petri con medio de selección. Lo restante de la mezcla es incubado a 37°C con agitación, pero muy lentamente. Se detiene la conjugación a un tiempo adecuado (30' ó 60'). Se centrifuga y se lava dos veces con NN. Se plaquea 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} en medio de selección y se incuba por 48 horas, a 37°C.

10. Determinación de Actividad de Citrato Sintasa (40)

Utilizamos el método que mide -SH, usándose 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoato. DTNB ó Reactivo de Ellman's). Esta

reacción es fácilmente seguida a 412 nm, donde el ión mercáptido tiene una gran absorción ($E = 13,600$); ninguno de los reactivos absorben a esta longitud de onda. El pH debe limitarse a un rango de 7.4 a 9.0.

- Obtención del extracto.

Para realizar la actividad enzimática de las cepas MX1150 y MX1152, se crecieron ambas cepas hasta alcanzar la fase logarítmica en medio mínimo con 0.2% de gluconato de sodio, 15 mM de NH_4^+ , 0.12 mM de glutamato y los demás requerimientos. Se utilizó este medio dado a que la síntesis de citrato sintasa es sujeta a represión catabólica por glucosa (15).

Se sacaron los cultivos a 80 u.k., se centrifugaron a 7,000 rpm por 10 min, y se resuspendieron en 1 ml de 20 mM Tris-HCl pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 y 0.1 M KCl.

Se sonicaron las células con tres pulsos de un minuto con 50 seg de intervalo. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min. Se tomaron los sobrenadantes y se midieron las actividades enzimáticas.

- Procedimiento.

Se añadió a una celda:

- DTNB 0.1 ml
- Acetil-CoA 0.03 ml
- H₂O 0.77 ml
- Extracto celular 0.05 ml

La absorción fue seguida a 412 nm por 3 min para medir la actividad de deacilasa de acetil-CoA. Se empezó la reacción de la citrato sintasa con la adición de 0.05 ml de oxaloacetato.

- Reactivos.

- DTNB, 1mM: 3.9 mg de DTNB disuelto en 10 ml de 1 M Tris-HCl pH 8.1.
- Acetil-CoA, 10 mM: 10 mg de acetil-CoA disuelta en 1 ml de H₂O.
- Oxaloacetato, 10 mM: 1.32 mg de oxaloacetato disuelto en 1 ml de Tris-HCl 0.1 M.

Se determinó la proteína de los extractos celulares por el método de Lowry (27).

Se reportaron las actividades específicas en nanomoles de citrato formado a 37°C x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

11. Pozas de α -cetoglutarato

Cultivos de 250 ml en medio mínimo NN, con glucosa como

fuentes de carbono y con diferentes fuentes nitrogenadas como descrito anteriormente, fueron cultivados en matraces Erlenmeyer de 1 litro. Se incubaron en incubadoras giratorias a 37°C, y cuando alcanzaron una turbidez de ~80 unidades Klett, fueron centrifugados 10 min a 6,000 rpm, de 0-4°C en un rotor GSA, en una centrífuga Sorvall RC-5B.

Para la determinación de α -cetoglutarato, a las pastillas celulares de 100 ml de cultivo se agregó 1 ml de 0.3 M HClO_4 con 1 mM EDTA (frío). Se agitó la mezcla vigorosamente en un vortex y se centrifugó 15 min a 12,000 rpm. Se calculó el volumen total del sobrenadante, se tomó 0.5 ml de éste y se ajustó el pH entre 3.0 y 4.0, con K_2CO_3 y se centrifugó nuevamente por 15 min a 12,000 rpm para eliminar el precipitado. El sobrenadante fue ajustado al volumen y guardado a -70°C.

Se determinó el α -cetoglutarato en una mezcla de reacción conteniendo en un volumen final de 1 ml, los siguientes reactivos (26):

- 40 mM buffer imidazole-acetato pH 6.9
(20 mM imidazole base : 20 mM imidazole acetato)
- 25 mM acetato de amonio
- 0.1 mM ADP
- 0.1 mM NADH
- 0.1 ml del extracto celular
- 8 μ l de glutamato deshidrogenasa (GDH) bovina

(tipo III, Sigma catálogo No. G-7882, 1 mg/ml en 20 mM Tris-HCl pH 8.1 - 0.1 mM ADP).

Se midió espectrofotométricamente la oxidación de NADH a 340 nm. Las absorbancias iniciales y finales de las mezclas de reacción fueron tomadas antes y 15 min después de adicionar la enzima, utilizando como estándar el decaimiento en absorbancia de las mezclas sin extractos pero conteniendo entre 0.5 y 20 nanomoles de estándares de α -cetoglutarato.

Se determinó la cantidad total de proteínas en los extractos por el método de Lowry (27).

Las pozas intracelulares de α -cetoglutarato fueron reportadas en nanomoles / mg de proteína.

12. Pozas de Aminoácidos

Otros 100 ml de los cultivos fueron centrifugados como mencionado en el procedimiento para las Pozas de α -cetoglutarato, y las pastillas celulares tratadas con 4 ml de metanol y agua destilada hasta 5 ml. Se agitaron vigorosamente las mezclas y se centrifugaron a 12,000 rpm en frío y los sobrenadantes fueron guardados a -70°C .

Los aminoácidos fueron determinados con o-ftalaldehído (OPA), (25).

Los OPA de los derivados fueron separados y cuantificados por HPLC (high performance liquid chromatography).

La determinación de aminoácidos libres y totales por Cromatografía de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, es más rápida y sensible que la clásica determinación por cromatografía de Intercambio iónico, en donde una vez separados los aminoácidos, éstos son derivados ya sea con ninhidrina, con fluorescamina ó con o-ftalaldehído (OPA). La técnica HPLC en fase reversa consiste en formar el derivado del aminoácido antes de que entre a la columna, en este caso se emplea como agente derivante al o-ftalaldehído (OPA).

El único inconveniente de emplear OPA es que no es posible obtener derivados de aminoácidos secundarios, ya que no reaccionan.

Se utilizó un equipo modular System Gold de Beckman, que consta de una válvula de inyección acoplada a un loop de 5 μ l (Altex 210A), un programador de solventes (Módulo 126), detector de fluorescencia (Módulo 157) controlador Nec (PC-8300) y un integrador (Modelo 427). Una columna Ultrasphere XL ODS 3 μ m, 4.6 mm x 7.00 cm.

- Reactivos.

Metanol grado HPLC de Baker No. cat. 9093-62, H₂O grado HPLC,

Obtención por el uso de cartuchos Norganic de Millipore.
No. cat. XX1500-710.

Aminoácidos estándares de Pierce, No. cat. 20065.

Acetato de sodio trihidratado de Sigma, No. cat. S-8625.

*Reactivo OPA/mercaptoetanol de Beckman, No. cat. 338048.

- Procedimiento cromatográfico.

Se filtran y se degasifican las fases móviles A (acetato de sodio 50 mM pH 6.8) y B (metanol).

El gradiente de elución se inicia en el 10% del eluyente B, en el tiempo cero y continúa de acuerdo al siguiente esquema:

| TIEMPO (min) | %B | DURACION (min) |
|-----------------|-------|-------------------|
| 0.0 | 10.0 | 0.0 |
| 0.0 | 15.0 | 5.0 |
| 5.0 | 22.5 | 3.0 |
| 16.0 | 100.0 | 5.0 |

Se lleva al 100% de metanol para lavar la columna y permanece en este porcentaje durante 10 min, procediendo enseguida a equilibrar el sistema con el 10% de B. El flujo de la fase móvil es de 1.5 ml/min.

- Procedimiento de derivación.

Alicuotas de treinta microlitros de los extractos metanólicos fueron filtradas (filtro Millipore de 0.22 μ m) y adicionadas a 300 μ l del reactivo OPA/MCE. Se agitó

y se esperó 2 min para que ocurriera la derivación. Transcurrido este tiempo, se inyectaron 5 μ l en el sistema cromatográfico. Los derivados de OPA fueron eluidos por elución isocrática. El eluyente A y el eluyente B fueron mezclados en una relación 62:38 y bombeados a un flujo con velocidad de 1.5 ml/min. La absorbancia de los eluatos fue monitoriada a 418 nm de emisión, después de una excitación a 305-395 nm. Los derivados de OPA de L-glutamato y L-glutamina, los cuales comigran con los estándares, eluyeron como picos a los 3.5 y 9.8 minutos, respectivamente.

La concentración de proteína fue estimada por el método colorimétrico de Lowry (27).

TABLA 1. Cepas Bacterianas

| <u>Cepas</u> | <u>Genotipo o Fenotipo Relevante</u> |
|--------------|--|
| MX614 | F ⁻ Δ (<u>lac-pro</u>) <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>galE</u> |
| MX1146 | F ⁻ <u>supE44</u> (<u>glnV44</u>) <u>gltA6</u> λ^- Gal ⁺ |
| MX1148 | F ⁻ Δ (<u>lac-pro</u>) <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> |
| JC158 | Hfr <u>thi-1</u> <u>leu⁺</u> <u>serA6</u> <u>StrA⁺</u> |
| MX1150 | F ⁻ <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>galE</u> |
| MX1152 | F ⁻ <u>ilv-680</u> <u>thi-1</u> <u>gltA6</u> |
| AB1157 | F ⁻ <u>thr-1</u> <u>leu-6</u> <u>ara⁻</u> <u>pro⁻</u> <u>lac⁻</u> T ₆ ^R <u>gal</u> λ^- <u>his⁻</u> <u>Sm^R</u> <u>xyl</u> <u>mtl⁻</u> <u>arg⁻</u> <u>thi-1</u> |
| W620, gal7 | F ⁻ <u>supE44</u> (<u>glnV44</u>) <u>gltA6</u> <u>galK30</u> λ^- <u>pyrD36</u> <u>relA1</u> <u>rpsL129</u> <u>thi-1</u> |

RESULTADOS

Actividad de Citrato Sintasa

Después de obtener la cepa mutante MX1152 (gltA), como se describió en Material y Métodos, procedimos a analizar la actividad específica de la enzima citrato sintasa para confirmar que nuestra mutante no tenía actividad de dicha enzima. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 2.

Crecimiento de MX1150 y MX1152 en función del suministro de nitrógeno y carbono

Los resultados de los experimentos de crecimiento se encuentran en las Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, así como en la Tabla 3.

Ambas cepas, MX1150 (gltA⁺) y MX1152 (gltA6) crecieron muy similarmente, con tiempos de generación parecidos en medio mínimo con glucosa, en todas las condiciones de fuentes nitrogenadas examinadas, excepto con los iones NH_4^+ , 15 mM ó 0.5 mM de NH_4^+ (figuras 1 y 3), solo MX1150 pudo crecer normalmente.

En medios conteniendo 6.8 mM de glutamina (fig. 5) ó con 12 mM de glutamato y 15 mM de NH_4^+ (fig. 2), ambas

cepas crecieron con tiempos de generación cerca de los 50 min.

Ambas cepas crecieron lentamente en glucosa-12 mM glutamato, con tiempos de generación de 140 min (fig. 7). Sin embargo, mejoraron considerablemente sus velocidades de crecimiento cuando se añadió 15 mM NH_4^+ junto con 12 mM de glutamato (fig. 2). Estos resultados parecen indicar que las células pasan por una privación de NH_4^+ , cuando el glutamato es la única fuente de nitrógeno, para poder sintetizar glutamina a través de glutamino sintetasa. Otros datos corroboran indicando que lo que podría estar pasando en condiciones en que el glutamato es la única fuente nitrogenada, realmente es la escasez de NH_4^+ . Como se puede observar en la figura 9, en donde se añadió 15 mM de D-serina junto con 12 mM glutamato, los tiempos de generación son muy similares a los obtenidos cuando se añadió 15 mM NH_4^+ a 12 mM glutamato. Esto indica que la mejoría en estos tiempos de generación se debe a la abundancia de NH_4^+ intracelular. Dado que D-serina es una fuente nitrogenada que se degrada intracelularmente muy rápido generando NH_4^+ (36). Cuando se suministra D-serina 15 mM (fig. 8) como única fuente de nitrógeno, la cepa MX1150 logra crecer con un tiempo de generación de 69 min, pero la cepa MX1152 no logra hacerlo. Esto podría estar dado por la falta de esqueletos carbonados.

cepas crecieron con tiempos de generación cerca de los 50 min.

Ambas cepas crecieron lentamente en glucosa-12 mM glutamato, con tiempos de generación de 140 min (fig. 7). Sin embargo, mejoraron considerablemente sus velocidades de crecimiento cuando se añadió 15 mM NH_4^+ junto con 12 mM de glutamato (fig. 2). Estos resultados parecen indicar que las células pasan por una privación de NH_4^+ , cuando el glutamato es la única fuente de nitrógeno, para poder sintetizar glutamina a través de glutamino sintetasa. Otros datos corroboran indicando que lo que podría estar pasando en condiciones en que el glutamato es la única fuente nitrogenada, realmente es la escasez de NH_4^+ . Como se puede observar en la figura 9, en donde se añadió 15 mM de D-serina junto con 12 mM glutamato, los tiempos de generación son muy similares a los obtenidos cuando se añadió 15 mM NH_4^+ a 12 mM glutamato. Esto indica que la mejoría en estos tiempos de generación se debe a la abundancia de NH_4^+ intracelular. Dado que D-serina es una fuente nitrogenada que se degrada intracelularmente muy rápido generando NH_4^+ (36). Cuando se suministra D-serina 15 mM (fig. 8) como única fuente de nitrógeno, la cepa MX1150 logra crecer con un tiempo de generación de 69 min, pero la cepa MX1152 no logra hacerlo. Esto podría estar dado por la falta de esqueletos carbonados.

También se vió que células de MX1152, en medio mínimo con glucosa-0.5 mM NH_4^+ crecieron con tiempos de generación de 126 min, cuando la concentración externa de glutamato fue de 0.12 mM, pero cambió a 58 min de tiempo de generación cuando la concentración de glutamato subió a 12 mM (figuras 3 y 4, tabla 3). Un efecto similar en la concentración de glutamato fue observado con células de MX1150 en medio mínimo con glucosa y 15 mM NH_4^+ . Estos resultados sugieren que debido a la incapacidad de que las células gltA metabolicen glucosa vía el ciclo de Krebs, glutamato y glutamina deben ser suministrados en concentraciones de sustrato para obtener velocidades de crecimiento óptimas.

Otros experimentos realizados indican que ni glutamina ni glutamato, con o sin 15 mM NH_4^+ pueden ser usados por MX1150 o MX1152, como única fuente de carbono, en ausencia de glucosa.

Además, la cepa MX1152 es incapaz de crecer en un medio que contenga acetato de sodio como fuente de carbono, independiente de la fuente nitrogenada que se suministre (12). Pero logra crecer en un medio con glucosa y acetato suministrados simultáneamente. Eso indica que el acetato no juega un papel inhibitorio. Simplemente no puede ser metabolizado, ya que su asimilación depende de la ruta del glioxilato (figura 10).

También se observó que cuando se añade 15 mM de NH_4^+ a un medio que contenga 6.8 mM de glutamina, no hay ningún incremento notorio en las velocidades de crecimiento de ambas cepas (figs. 5 y 6, tabla 3). Eso indica que la glutamina por si sola es capaz de suplir todas las necesidades metabólicas tanto en la cepa mutante como en la silvestre. Es de hacerse notar que la única fuente nitrogenada capaz de suplir la auxotrofia de la cepa MX1152 por glutamato, es la glutamina.

Regulación de glutamino sintetasa

La actividad específica y el estado de adenilación de la glutamino sintetasa (GS) fueron determinados en ambas cepas MX1150 y MX1152, en diferentes medios de cultivo, como se indica en la Tabla 4.

Los resultados indican que la enzima glutamino sintetasa se encuentra elevada y no adenilada, cuando ambas cepas fueron cultivadas en fuentes limitantes de nitrógeno. En contraste, bajos niveles y casi totalmente adenilada fue la característica de la glutamino sintetasa cuando creció en medio mínimo con glucosa y 15 mM NH_4^+ y en ambas cepas, MX1150 y MX1152 con 15 mM NH_4^+ y una fuente limitante de nitrógeno adicional, como glutamato ó glutamina.

En la única condición en que no fue posible realizar ensayos de actividad enzimática fue con la cepa MX1152 en 15 mM NH_4^+ y 0.12 mM glutamato, ya que esta cepa crece solamente hasta 30 u.k.

Así, si juzgamos por la actividad de glutamino sintetasa ambas células gltA⁺ y gltA6, dan respuestas normales de Ntr, independientemente de las velocidades de crecimiento en las fuentes nitrogenadas examinadas.

Pozas de α -cetoglutarato, glutamina y glutamato

Medimos los tamaños de las pozas intracelulares de estos tres metabolitos, en MX1150 y MX1152, crecidas bajo limitación y exceso de nitrógeno. Estos resultados se encuentran en la Tabla 5.

Las células gltA⁺ tienen más grandes las pozas de glutamato comparadas con células gltA6, en todas las condiciones en que lograron crecer; una consecuencia lógica, dada a la incapacidad de la cepa MX1152 de sintetizar glutamato vía el ciclo de Krebs.

Las pozas de glutamina y de α -cetoglutarato fluctúan entre límites cercanos, entre 0.49 y 1.98 nmoles x mg de proteína⁻¹, mientras que las de glutamato fueron significativamente grandes.

Las pozas de α -cetoglutarato de ambas cepas, MX1150 y MX1152 fueron 2.5 a 4.0 veces más grandes en limitación de nitrógeno que en exceso de nitrógeno.

Las pozas de glutamina fueron similares en células MX1150, aunque crecidas en fuentes limitantes o de exceso de nitrógeno. Pero fueron 1.1 a 2.4 veces más elevadas que las de las células MX1152, crecidas bajo condiciones similares de fuentes nitrogenadas.

Estos resultados indican que como consecuencia de la incapacidad de las células gltA6 para metabolizar glucosa vía el ciclo de Krebs, deben sintetizar todo su α -cetoglutarato a expensas del glutamato y/o glutamina, y que su poza de glutamina es siempre menor que la de las células gltA⁺.

No se pudo determinar las pozas intracelulares de la cepa MX1152, en la condición de 15 mM NH_4^+ con 0.12 mM de glutamato, porque esta cepa logra crecer hasta 30 u.k., y las demás pozas fueron analizadas a partir de extractos celulares que habían alcanzado ~ 80 unidades Klett.

A pesar de intentar de diferentes formas limpiar los aminoácidos cuando se encontraban como sustrato en el

medio, no pudimos lograr obtener resultados menos elevados. Como es el caso de las pozas de glutamato en condiciones en que se creció la cepa con 12 mM de glutamato. Obtuvimos valores altos como 138, 79, 145 y 108 nmoles/mg de proteína, con desviaciones estándares muy grandes.

Tampoco pudimos eliminar la contaminación por el aminoácido en el medio cuando utilizamos glutamina como fuente de nitrógeno. Los valores obtenidos para la poza de glutamina, utilizando glutamina como fuente de nitrógeno, son bastante elevados si consideramos la poza de glutamina en otras condiciones de limitación de nitrógeno. Para MX1150 obtuvimos 2.92 nmoles/mg de proteína, y para MX1152, 2.63 nmoles/mg de proteína. Las desviaciones estándares en esta condición son igualmente elevadas 1.39 y 1.20.

El tamaño de las pozas de glutamato y glutamina en células silvestres MX1150, crecidas en glucosa-15 mM NH_4^+ fue comparable a los datos previamente reportados en otra cepas de E.coli K-12 crecida bajo condiciones similares (22).

De acuerdo con la hipótesis de la cascada bicíclica, la relación calculada de $\text{gln}/\alpha\text{-KG}$ fue elevada, de 1.94 a 2.24 para MX1150 y de 1.62 para MX1152, cuando crecida

en exceso de NH_4^+ (con suplemento de 12 mM para la última cepa). Las relaciones fueron bajas cuando se crecieron las cepas en fuentes limitantes de nitrógeno, como en el caso de la condición de 0.5 mM NH_4^+ con 0.12 mM glutamato, en que las relaciones obtenidas fueron 0.71 y 0.43, para MX1150 y MX1152, respectivamente.

Las relaciones gln/ α -KG obtenidas cuando se crecieron las cepas MX1150 y MX1152 en 12 mM glutamato fueron bajas, 0.62 y 0.43, respectivamente.

En la Tabla 5 no se puso el cálculo de la relación gln/ α -KG en la condición en que se crecieron las cepas en glutamina, pues la relación no es real, dada la contaminación de la poza con el aminoácido del medio. Las relaciones gln/ α -KG serían de 1.63 para MX1150, y 1.52 para MX1152. Estas dos relaciones parecerían indicar una condición de exceso de amonio, y este no es el caso.

TABLA 2. Actividades Específicas de Citrato Sintasa

| Cepas | Actividad Especifica * |
|--------|------------------------|
| MX1150 | 72 |
| MX1152 | 0 (menor que 2) |

* nanomoles de citrato formado a 37°C x min^{-1} , x mg de proteína $^{-1}$.

TABLA 3. Tiempos de Generación

| Cepas | Fuente de Nitrógeno | Tiempo de Generación (min) |
|--------|--|-------------------------------|
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 48 |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 252 |
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 48 |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 50 |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 118 |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 126 |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 55 |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 58 |
| MX1150 | 12 mM glutamato | 144 |
| MX1152 | 12 mM glutamato | 140 |
| MX1150 | 6.8 mM glutamina | 49 |
| MX1152 | 6.8 mM glutamina | 51 |
| MX1150 | 6.8 mM glutamina + 15 mM NH_4^+ | 46 |
| MX1152 | 6.8 mM glutamina + 15 mM NH_4^+ | 49 |
| MX1150 | 15 mM D-serina | 69 |
| MX1152 | 15 mM D-serina | NC* |
| MX1150 | 15 mM D-serina + 12 mM glutamato | 51 |
| MX1152 | 15 mM D-serina + 12 mM glutamato | 55 |

* NC = no creció.

TABLA 4. Actividades Específicas de Glutamino Sintetasa y grado de adenilación (ñ)

| Cepas | Fuentes de Nitrógeno | Glutamino Sintetasa* (ñ) |
|--------|--|-----------------------------|
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 198(8) |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | ** |
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 179(8) |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 185(6) |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1369(4) |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1468(4) |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 1236(3) |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 1046(4) |
| MX1150 | 12 mM glutamato | 1672(4) |
| MX1152 | 12 mM glutamato | 1473(4) |
| MX1150 | 6.8 mM glutamina | 1904(4) |
| MX1152 | 6.8 mM glutamina | 1729(5) |

* Actividad Específica expresada en nanomoles de γ -glutamil hidroxamato formado a $37^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

** no se pudo determinar la actividad específica, ya que la cepa crece solamente hasta 30 u.k.

- La actividad de glutamino sintetasa fue determinada cuando las células llegaron a una turbidez de ~80 unidades Klett, después de incubación a 37°C en medio mínimo NN con glucosa y sus requerimientos. Cada valor de las actividades específicas de GS fue determinado por lo menos tres veces.

TABLA 4. Actividades Específicas de Glutamino Sintetasa y grado de adenilación (\bar{n})

| Cepas | Fuentes de Nitrógeno | Glutamino Sintetasa* (\bar{n}) |
|--------|--|---------------------------------------|
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 198(8) |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | ** |
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 179(8) |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 185(6) |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1369(4) |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1468(4) |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 1236(3) |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 1046(4) |
| MX1150 | 12 mM glutamato | 1672(4) |
| MX1152 | 12 mM glutamato | 1473(4) |
| MX1150 | 6.8 mM glutamina | 1904(4) |
| MX1152 | 6.8 mM glutamina | 1729(5) |

* Actividad Específica expresada en nanomoles de γ -glutamil hidroxamato formado a 37°C x min^{-1} x mg de proteína $^{-1}$.

** no se pudo determinar la actividad específica, ya que la cepa crece solamente hasta 30 u.k.

- La actividad de glutamino sintetasa fue determinada cuando las células llegaron a una turbidez de ~ 80 unidades Klett, después de incubación a 37°C en medio mínimo NN con glucosa y sus requerimientos. Cada valor de las actividades específicas de GS fue determinado por lo menos tres veces.

TABLA 5. Pozas Intracelulares de α -cetoglutarato, glutamato y glutamina,
y la relación entre glutamina y α -cetoglutarato.

| Cepa | Fuente de Nitrógeno | Pozas Intracelulares | | | Glutamina/ α -cetoglutarato |
|--------|--|-------------------------|--------------|-----------------|---------------------------------------|
| | | α -cetoglutarato | Glutamato* | Glutamina* | |
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 0.56 \pm 0.13 | 26 \pm 5 | 1.09 \pm 0.04 | 1.94 |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | NC | NC | NC | -- |
| MX1150 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 0.49 \pm 0.07 | 138 \pm 35 | 1.10 \pm 0.28 | 2.24 |
| MX1152 | 15 mM NH_4^+ + 12 mM glutamato | 0.59 \pm 0.15 | 79 \pm 13 | 0.96 \pm 0.04 | 1.62 |
| MX1150 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1.98 \pm 0.22 | 40 \pm 8 | 1.41 \pm 0.30 | 0.71 |
| MX1152 | 0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM glutamato | 1.31 \pm 0.23 | 13 \pm 1 | 0.57 \pm 0.15 | 0.43 |
| MX1150 | 12 mM glutamato | 1.98 \pm 0.50 | 145 \pm 36 | 1.23 \pm 0.45 | 0.62 |
| MX1152 | 12 mM glutamato | 1.51 \pm 0.13 | 108 \pm 30 | 0.65 \pm 0.07 | 0.43 |
| MX1150 | 6.8 mM glutamina | 1.79 \pm 0.23 | 62 \pm 6 | 2.92 \pm 1.39 | -- |
| MX1152 | 6.8 mM glutamina | 1.73 \pm 0.30 | 24 \pm 6 | 2.63 \pm 1.20 | -- |

NC = no se pudo determinar las pozas intracelulares, ya que la cepa crece solamente hasta 30 u.k.

\pm = desviación estándar

- Las pozas intracelulares están reportadas en nanomoles/mg de proteína. Cada valor fue determinado por lo menos tres veces. Las pozas intracelulares fueron determinadas cuando las células llegaron a una turbidez de ~80 unidades Klett, después de la incubación a 37°C, en medio mínimo NN con glucosa y sus requerimientos como se describió en Material y Métodos.

* Todos nuestros esfuerzos para determinar glutamato y glutamina en células crecidas en glutamato y glutamina, respectivamente, resultaron muy elevados debido a contaminación con aminoácidos del medio.

15 mM NH_4^+ + 0.12 mM GLUTAMATO

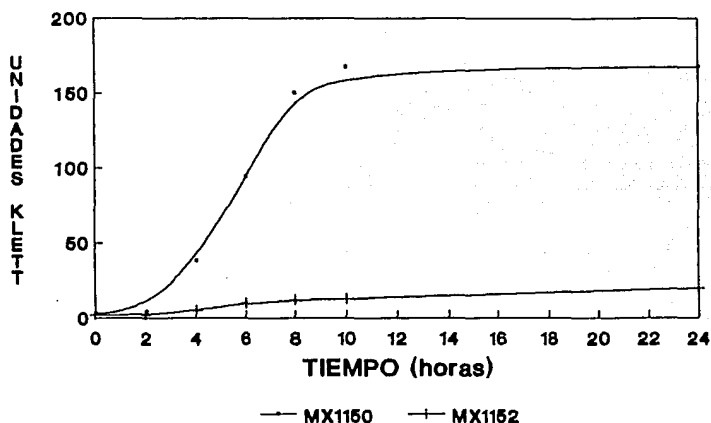


FIGURA 1: Curvas de Crecimiento. Con la fuente de nitrógeno indicada. Las células fueron crecidas a 37°C, en medio mínimo NN con glucosa y sus requerimientos, como se describió en Material y Métodos.

15 mM NH_4^+ + 12 mM GLUTAMATO

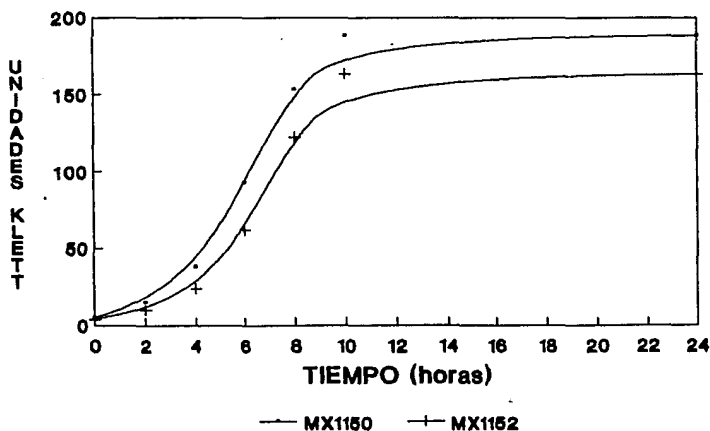
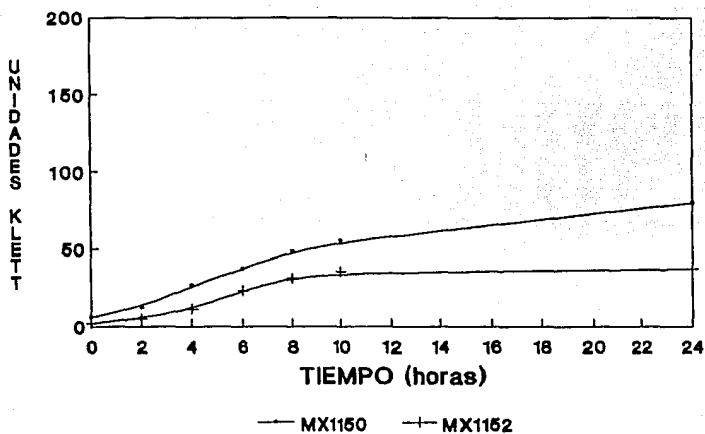
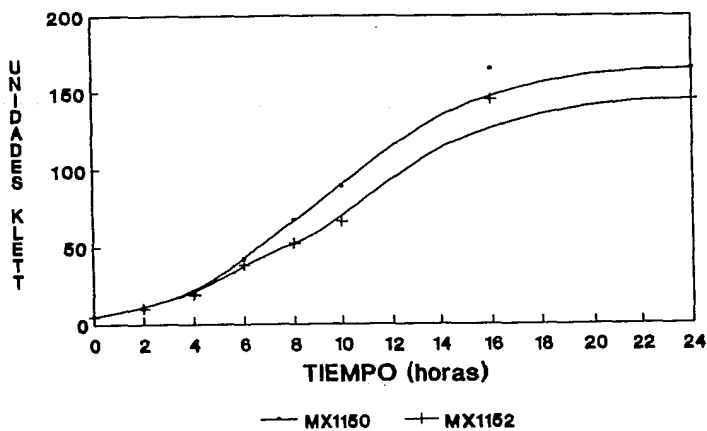


FIGURA 2: Curvas de Crecimiento. Igual que en Fig. 1.

0.5 mM NH_4^+ + 0.12 mM GLUTAMATOFIGURA 3: Curvas de Crecimiento. Igual que en la Fig. 1.0.5 mM NH_4^+ + 12 mM GLUTAMATOFIGURA 4: Curvas de Crecimiento. Igual que en la Fig. 1.

6.8 mM GLUTAMINA

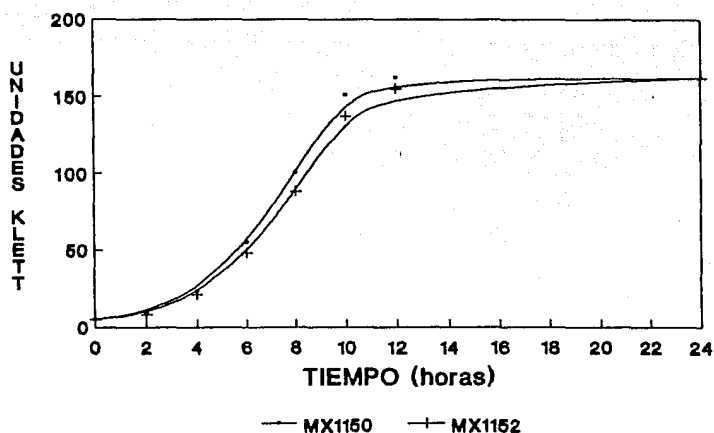


FIGURA 5: Curvas de Crecimiento. Con la fuente de nitrógeno indicada, y la fuente de carbono y requerimientos como en la fig. 1.

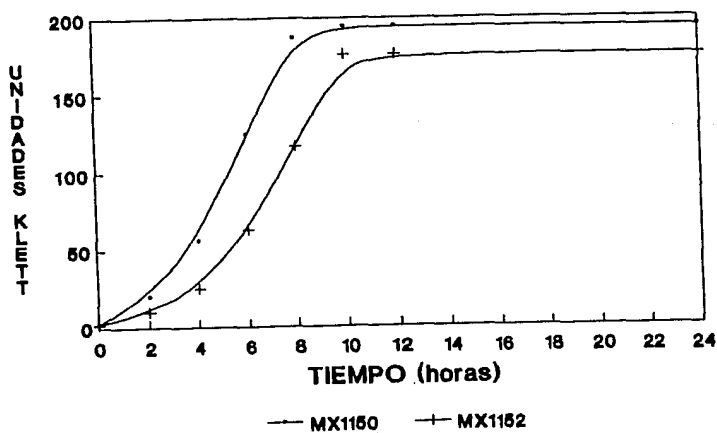
6.8 mM GLUTAMINA + 15 mM NH_4^+ 

FIGURA 6: Curvas de Crecimiento. Igual que en la fig. 5.

12 mM GLUTAMATO

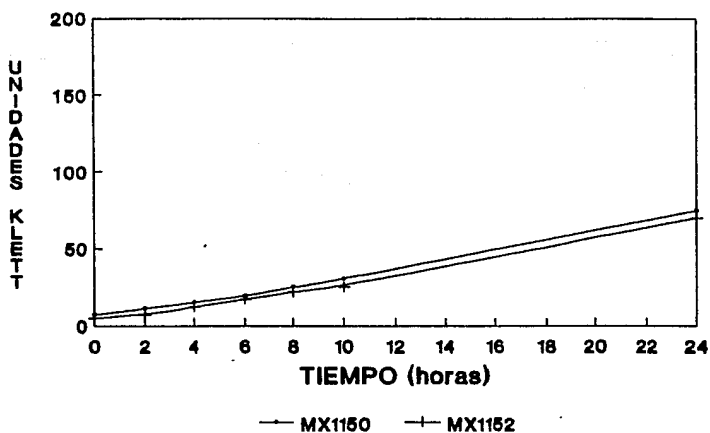
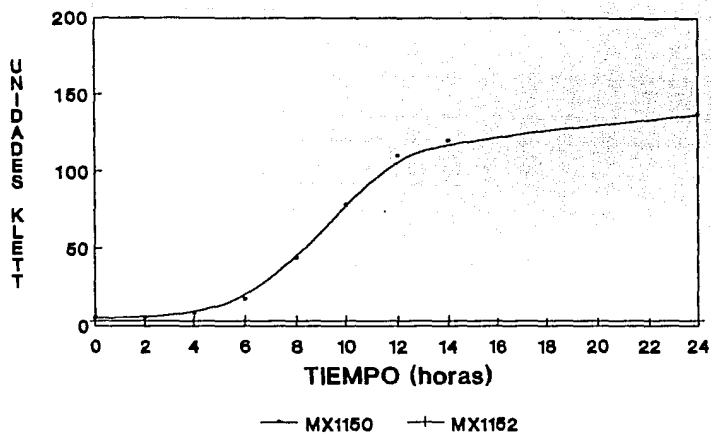
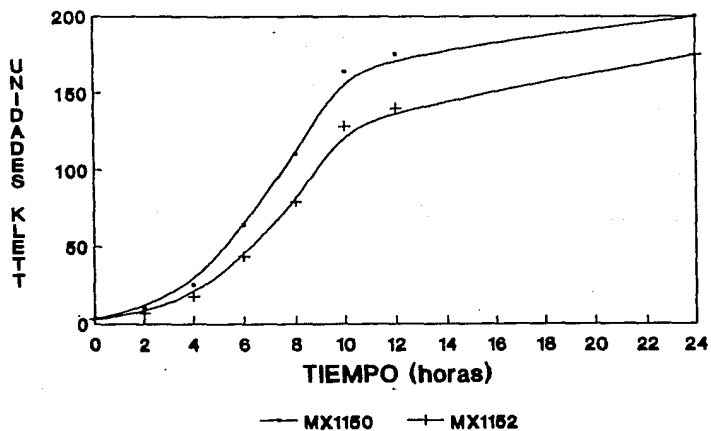


FIGURA 7: Curvas de Crecimiento. Con la fuente de nitrógeno indicada, y la fuente de carbono y requerimientos como en la fig. 1.

15 mM D-SERINA

FIGURA 8: Curvas de Crecimiento. Igual que en la fig. 7.

12 mM GLUTAMATO + 15 mM D-SERINA

FIGURA 9: Curvas de Crecimiento. Igual que en la fig. 7.

DISCUSION

Se estudió el patrón de crecimiento y de la regulación nitrogenada en una cepa silvestre de E.coli y una cepa derivada que no tiene actividad de citrato sintasa, cuando se crecieron ambas cepas en medio mínimo, con glucosa y NH_4^+ , glutamato o glutamina, como fuente nitrogenada. Los resultados obtenidos conllevan a importantes implicaciones respecto al metabolismo nitrogenado y carbonado en enterobacterias. Dada su incapacidad de derivar citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs a partir de glucosa, las mutantes gltA son auxótrofas de glutamato (13). Los experimentos esquematizados en la Figura 7 y en la Tabla 3, muestran que 12 mM de glutamato satisface el requerimiento de la cepa MX1152 (gltA6), pero es una fuente pobre de nitrógeno para ambas cepas, MX1150 y MX1152. Velocidades óptimas de crecimiento se obtuvieron cuando 15 mM de amonio fue suministrado en adición de glutamato (Fig. 2) o con 6.8 mM de glutamina (Fig. 5), como única fuente de nitrógeno.

Puesto que, células MX1152 no logran crecer en medio mínimo con glucosa más 15 mM de NH_4^+ , los resultados indican que glutamato y/o glutamina son degradados por células gltA6, para derivar no solo nitrógeno, pero también esqueletos de carbono y energía para el crecimiento

celular.

Dado que E.coli K-12 y sus derivadas no poseen una enzima glutamato deshidrogenasa catabólica (44,45), los resultados parecen indicar que en ambas cepas, MX1150 y MX1152, los iones NH_4^+ son requeridos junto con glutamato para sintetizar glutamina vía glutamino sintetasa. Solamente así el catabolismo de la glutamina podría producir iones NH_4^+ para reciclarse.

La cepa MX1152 es capaz de disparar la respuesta Ntr, así como la cepa MX1150, como se vió en los datos obtenidos y a su capacidad de sintetizar niveles desreprimidos de glutamino sintetasa, cuando se sujetaron las células a limitación de nitrógeno en medio mínimo con glucosa y con glutamato o glutamina. Como era de esperarse, la adición de amonio a un medio con limitación de nitrógeno causa en células MX1152 la represión en los niveles de síntesis de glutamino sintetasa (Tabla 4).

Existen dos clases de fuentes nitrogenadas. La primera clase de compuestos se degradan derivando amonio, como, ejemplo están la D- y L-serina. La segunda clase de fuentes nitrogenadas consiste en compuestos que se degradan para dar glutamato, como es el caso de prolina o aspartato, o que pueden formar glutamato a partir de reacciones de transaminación (36).

Algunos aminoácidos generan glutamato y amonio cuando se degradan.

Escogimos utilizar la primera clase de compuestos, ya que D-serina se degrada muy rápidamente, intracelularmente, liberando amonio (36).

De los experimentos en que se utilizó D-serina como fuente de nitrógeno (Figs. 8 y 9), se puede concluir que en realidad el crecimiento tan lento de ambas cepas en 12 mM glutamato se debe a la falta de NH_4^+ intracelular. Como D-serina libera amonio intracelularmente se observa que el crecimiento en 15 mM D-serina con 12 mM glutamato es casi idéntico al observado con 15 mM NH_4^+ con 12 mM glutamato, tanto en la cepa silvestre MX1150 como en la cepa mutante MX1152.

También se puede observar que cuando se suministra D-serina como única fuente de nitrógeno, la cepa MX1150 puede crecer, pero la cepa MX1152 no lo puede hacer. Esto debido a la falta de esqueletos carbonados, como también ocurre cuando se crece la cepa MX1152 en medio mínimo con 15 mM NH_4^+ y 0.12 mM glutamato (Figs. 1 y 8).

Los resultados de las determinaciones de los tamaños de las pozas de α -cetoglutarato y glutamina realizados en MX1150 y MX1152, hacen pensar y concluir que la relación

entre gln/ α -KG es como se esperaba de acuerdo con la hipótesis de la cascada bicíclica. Así pues, ambas cepas dan relaciones de gln/ α -KG del orden de 0.5, cuando son crecidas bajo limitación de nitrógeno, como con glutamato ó 0.5 mM NH_4^+ , y del orden de 2.0, cuando son crecidas en exceso de amonio.

Los hallazgos de la poza de α -cetoglutarato en MX1152, son una clara indicación de que glutamato y/o glutamina son degradados en la cepa para formar otros compuestos.

En medio mínimo con glucosa, glutamato es una fuente pobre de nitrógeno para ambas cepas, MX1150 y MX1152, esto no es debido a que se transporte ineficientemente, sino porque requiere iones NH_4^+ para formar glutamina, la cual a su vez es más factible a sufrir degradación que glutamato.

La interrogante acerca de si glutamato y/o glutamina pueden ser utilizados como únicas fuentes de carbono y nitrógeno fue examinada. Los resultados demuestran que ni la cepa MX1150 ni MX1152 son capaces de crecer en 12 mM de glutamato con o sin NH_4^+ o en 6.8 mM de glutamina como fuente de carbono. Experimentos con C^{14} nos podrían ayudar a comprender si los átomos de carbono del α -cetoglutarato en células gltA6, en medio mínimo con glucosa-glutamato o glucosa-glutamina son

derivados de glucosa o de los aminoácidos o de ambos. No sería una sorpresa si bajo condiciones similares de crecimiento, aún las células gltA⁺ derivasen parte de su poza de α -cetoglutarato de glutamato y/o glutamina.

La transaminación de glutamato con oxaloacetato, como aceptor de grupos amino con subsecuente desaminación de aspartato a fumarato y NH_4^+ vía aspartato amoníaco, ha sido propuesto para el catabolismo de glutamato en mutantes de E.coli capaces de usar este aminoácido como única fuente de carbono y nitrógeno (29). En células silvestres de E.coli incapaces de usar glutamato como fuente única de nitrógeno y carbono, esta vía no parece ser la preferente para catabolizar glutamato, particularmente porque no logra explicar las propiedades del NH_4^+ para acelerar el crecimiento, cuando se añade a cultivos de glucosa-glutamato en ambas cepas MX1150 y MX1152 (Figs. 2 y 4, Tabla 3).

Si la degradación de glutamato requiere iones NH_4^+ para ser convertido a glutamina, como nuestros experimentos parecen indicar, necesitaríamos explicar cómo las células derivan α -cetoglutarato a partir de glutamina. La actividad de glutaminasa, que puede convertir glutamina en glutamato y NH_4^+ no ha sido estudiada todavía. Esta vía sería una de las posibilidades para explicar la degradación de glutamina, pero el problema sería todavía el explicar

cómo convertir de glutamato a α -cetoglutarato.

Experimentos preliminares en nuestro laboratorio indican que la glutamina sufre degradación in vitro, utilizándose extractos celulares de E.coli para dar α -cetoglutarato, con la formación de un compuesto intermediario que es el α -cetoglutaramato (7). Si esta ruta es una de las responsables de la degradación de glutamina en células gltA6, todos los átomos de carbono del α -cetoglutarato serían derivados de glutamina. Esta ruta puede representar una alternativa en el ciclo de Krebs para la cepa MX1150, pero es, posiblemente, la única vía para la biosíntesis de α -cetoglutarato en MX1152. Cualesquiera que sean los mecanismos enzimáticos relacionados a la degradación de glutamina, es claro que no deben ser regulados por nitrógeno, ya que operan eficientemente en presencia de exceso de NH_4^+ , cuando la enzima glutamino sintetasa es sintetizada en pequeñas cantidades y muy adenilada. En otras palabras, la conversión de glutamina a α -cetoglutarato no parece ser el paso que regula la relación intracelular gln/ α -KG en células gltA6 en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno.

Existen por lo menos tres alternativas por las cuales la poza de α -cetoglutarato puede ser metabolizada por células de E.coli. Una de ellas es la que utiliza α -cetoglutarato y amonio para hacer glutamato, vía glutamato deshidrogenasa, ya que tiene mayor afinidad o trabaja

preferentemente en condiciones de exceso de NH_4^+ , por la gran afinidad que posee esta enzima por sus sustratos, (38). Las otras rutas alternativas aparentemente trabajan bajo todas las condiciones de fuentes de nitrógeno, es decir, la condensación de α -cetoglutarato con glutamina para formar glutamato a través de la glutamato sintasa o eliminando un CO_2 para formar succinato y entrar al ciclo de Krebs, por la vía del complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Debido a la pérdida de la actividad de citrato sintasa, las células gltA6 son incapaces de sintetizar citrato, y por consiguiente, isocitrato y α -cetoglutarato. En consecuencia, también perdieron la función de la ruta del glioxilato, en todas las condiciones en que logra crecer. Las células gltA6 son incapaces de crecer en acetato-glutamina, probablemente porque uno o más de sus metabolitos faltantes son requeridos para la síntesis de piruvato y fosfoenolpiruvato, y para la síntesis de los metabolitos que derivan de ellos, como por ejemplo, las pentosas de los ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos y algunos alifáticos, histidina, etc. (23,33). En células silvestres gltA⁺, la síntesis de α -cetoglutarato a partir de glutamato y/o glutamina puede ser la más importante para alimentar el ciclo de Krebs, cuando normalmente no puede ser sintetizado por la isocitrato deshidrogenasa, como por ejemplo, cuando funciona la ruta del glioxilato (4,9,18).

El modelo dibujado en la Figura 10, resume las reacciones en que creemos que las células gltA6 utilizan para derivar nitrógeno, carbono y energía a partir del catabolismo de glutamato y/o glutamina. El estudio de algunas de las muchas interrogantes podrán ayudar a probar la veracidad del modelo.

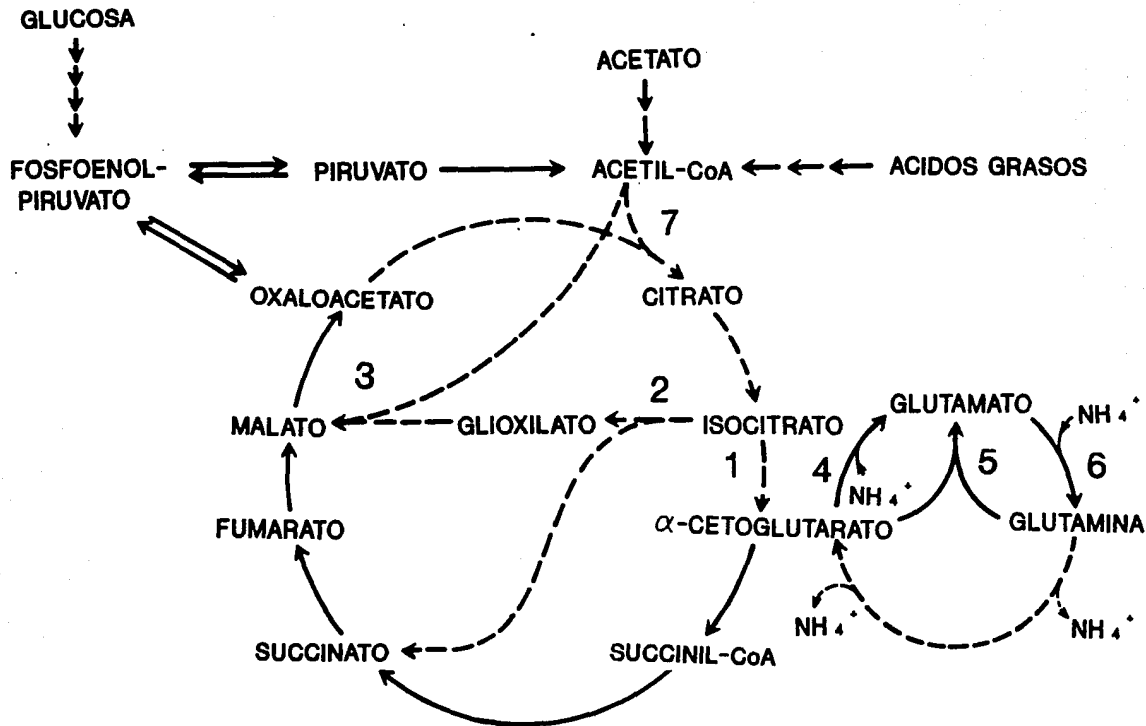


FIGURA 10: Ciclo de Krebs. Ruta propuesta para la conversión de glutamato y glutamina en α -cetoglutarato en células MX1152 (*gltA6*). Las rayas interrumpidas indican las reacciones que no se llevan a cabo en estas células, en el ciclo de Krebs y en la ruta del glioxilato, en consecuencia de la falta de actividad de citrato sintasa. Las líneas entre glutamina y α -cetoglutarato indican incertidumbre acerca de los pasos enzimáticos.

- FIGURA 10:**
1. Isocitrato Deshidrogenasa
 2. Isocitrato Liasa
 3. Malato Sintasa A
 4. Glutamato Deshidrogenasa (GDH)
 5. Glutamato Sintasa (GOGAT)
 6. Glutamino Sintetasa (GS)
 7. Citrato Sintasa

BIBLIOGRAFIA

1. Bachmann, B.J. (1990). Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 8. Microbiological Reviews, 54: 130-197.
2. Backman, K.C., Chen, Y.-M., Ueno-Nishio, S. and Magasanik, B. (1983). The product of glnL is not essential for regulation of bacterial nitrogen assimilation. Journal of Bacteriology 154: 516-519.
3. Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, Foor, F. and Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. Journal of Bacteriology 129: 1001-1009.
4. Bennett, P.M. and Holms, W.H. (1975). Reversible inactivation of isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli ML308 during growth on acetate. Journal of General Microbiology 87: 37-51.
5. Bueno, R., Pahel, G. and Magasanik, B. (1985). Role of glnB and glnD gene products in regulation of the glnALG operon of Escherichia coli. Journal of Bacteriology 164: 816-822.
6. Clark, A.J. (1963). Genetic analysis of a "double male" strain of Escherichia coli K12. Genetics 48: 105-120.
7. Cooper, A.J.L. and Meister, A. (1977). The glutamine transaminase- ω -amidase pathway. CRC Critical Reviews in Biochemistry 7: 281-302.
8. Covarrubias, A.A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F. and Bastarrachea, F. (1980). ColE1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine. Plasmid 3: 150-164.

9. El-Mansi, E.M.T., Nimmo, H.G. and Holms, W.H. (1986). Pyruvate metabolism and the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase in Escherichia coli. Journal of General Microbiology 132: 797-806.
10. Foor, F., Cedergren, R.J., Streicher, S.L. and Magasanik, B. (1978). Glutamine synthetase of Klebsiella aerogenes : properties of glnD mutants lacking uridylyltransferase. Journal of Bacteriology 134: 562-568.
11. Foor, F., Reuveny, Z. and Magasanik, B. (1980). Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the P_{II} protein in Klebsiella aerogenes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77: 2636-2640.
12. Frank, L. and Ranhand, B. (1964). Proline metabolism in Escherichia coli III. The proline catabolism pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics 107: 325-331.
13. Gilvarg, C. and Davis, B.D. (1956). The role of the tricarboxylic acid cycle in acetate oxidation in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry 222: 307-319.
14. Ginsburg, A., Stadtman, E.R. (1973) en: The Enzymes of glutamine Metabolism. Prusiner S. and Stadtman, E.R. (eds). Academic Press N.Y. pp. 9-44.
15. Gray, C.T., Wimpenny, J.W.T. and Mossman, M.R. (1966). Regulation of metabolism in facultative bacteria II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of krebs cycle enzymes in Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta 117: 33-41.
16. Herbert, A.A. and Guest, J.R. (1968). Biochemical and genetics studies with lysine + methionine

- mutants of Escherichia coli: lipoic acid and α -ketoglutarate dehydrogenase-less mutants. Journal of General Microbiology 53:363-381.
17. Hirschman, J., Wong, P.-K., Sei, K., Keener, J. & Kustu, S. (1985). Products of nitrogen regulatory genes ntxA and ntxC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntxA product is a σ factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82:7525-7529.
18. Holms, W. H. & Bennett, P. M. (1971). Regulation of isocitrate dehydrogenase activity in Escherichia coli on adaptation to acetate. Journal of General Microbiology 65:57-68.
19. Holtel, A. & Merrick, M. J. (1989). The Klebsiella pneumoniae P_{II} protein (GlnB gene product) is not absolutely required for nitrogen regulation and is not involved in NifL-mediated nif gene regulation. Molecular and General Genetics 217:474-480.
20. Igo, M. M., Ninfa, A. J., Stock, J. B. & Silhavy, T. J. (1989). Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. Genes and Development 3:1725-1734.
21. Keener, J. & Kustu, S. (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:4976-4980.
22. Kim, C.-H. & Hollocher, T. C. (1982). ¹³N isotope studies on the pathway of ammonia assimilation in Bacillus megaterium and Escherichia coli.

Journal of Bacteriology 151:358-366.

23. Kornberg, H. L. (1966). Anaplerotic sequences and their role in metabolism. Essays in Biochemistry 2:1-31.
24. Kustu, S., Hirschman, J., Burton, D., Jelesko, J. & Meeks, J. C. (1984). Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. Molecular and General Genetics 197:309-317.
25. Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. Analytical Chemistry 51:1667-1674.
26. Lowry, O. H. & Passonneau, J. V. (1972). A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press Inc., New York, pp.78-82.
27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265-270.
28. Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Annual Review of Genetics 16:135-168.
29. Marcus, M. & Halpern, Y. S. (1969). The metabolic pathway of glutamate in Escherichia coli K-12. Biochimica et Biophysica Acta 177:314-320.
30. Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
31. Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NR_I, by the glnL product, NR_{II}, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83:5909-5913.

32. Ninfa, A. J., Mullin, D. A., Ramakishnan, G., Stock, A., Magasanik, B. & Stock, J. (1988). Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and the regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:5492-5496.
33. Nimmo, H. G. (1987). The tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions. En Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, pp.156-159. Editado por F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
34. Reissig, J. L. & Wollman, E. L. (1963). Transduction des marqueurs galactose par les bactériophages tempérés 82 et 434 d'Escherichia coli. Annales des L'Institut Pasteur 105:774-779.
35. Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1985). Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82:1979-1983.
36. Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, pp.302-320. Editado por F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, D.C.

American Society for Microbiology.

37. Rhee, S. G., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. (1985). Glutamine synthetase from Escherichia coli. Methods in Enzymology 113:213-241.
38. Sakamoto, N., Kotre, M. & Savageau, M. A. (1975). Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli: purification and properties. Journal of Bacteriology 124:775-783.
39. Senior, P. J. (1975). Regulation of nitrogen metabolism in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes: studies with the continuous-culture technique. Journal of Bacteriology 123:407-418.
40. Srere, P. A. (1969). Citrate synthase. Methods in Enzymology 13:3-11.
41. Stadtman, E. R. & Chock, P. B. (1978). Interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation. Current Topics in Cellular Regulation 13:53-95.
42. Stadtman, E. R. (1973). En The Enzymes of Glutamine Metabolism. Prusiner S. and Stadtman, E. R. (eds). Academic Press N.Y. pp. 1-8.
43. Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annual Review of Biochemistry 47:1127-1162.
44. Varrichio, F. (1969). Control of glutamate dehydrogenase synthesis in Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta 177:560-564.
45. Vender, J. & Rickenberg, H. V. (1964). Ammonia metabolism in a mutant of Escherichia coli lacking glutamate dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta 90:218-220.
46. Young, C. C., Alvarez, J. D. & Bernlohr, R. W. (1990). Nutrient-dependent methylation of a membrane-associated protein of Escherichia coli. Journal of Bacteriology 172:5147-5153.