

03062



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL C. C. H.**

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO**

**LA ASIMILACION DE LA GLUTAMINA EN
Neurospora crassa**

T E S I S

**Que para obtener el Grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica**

Presenta el Licenciado :

**JORGE FERNANDO CALDERON
JIMENEZ**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Al Dr. Jaime Mora, con reconocimiento
a sus valiosas enseñanzas y afectuoso
estímulo.

En esta Tesis de Maestría se incluyen dos artículos; uno que se publicó en el Journal of Bacteriology en el mes de Febrero de 1985, en el Volúmen 161, páginas 807-809, con el título: ω -Amidase Pathway in the Degradation of Glutamine in Neurospora crassa, y otro, que se sometió a publicación al Biochemical and Biophysical Research Communications con el título: Glutamine Cycling in Neurospora crassa, el cual no fué aceptado para su publicación debido a que se sugirió que se mandara a otra revista. Adjunto el comentario de los árbitros a éste último artículo.

Biochemical and Biophysical Research Communications

Author(s): Jorge Calderon and Jaime Mora

Date:

12/18/84

Mailing Address: Centro de Investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno
Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
Cuernavaca, Morelos

Ms. No.: N-2432

Ms. Title: Glutamine Cycling in Neurospora crassa

Editors:

E. CARAFOLI
Laboratorium für Biochemie
ETH-Zentrum
CH-8092 Zurich, Switzerland

P. CUATRECASAS
Department of Molecular Biology
The Wellcome Research Laboratories
Burroughs Wellcome Company
Research Triangle Park, North Carolina 27709

I. C. GUNSALUS
1209 W. California
420 Roger Adams Laboratory
Department of Biochemistry
University of Illinois
Urbana, Illinois 61801

B. L. HORECKER
Roche Institute
of Molecular Biology
340 Kingsland Street
Nutley, New Jersey 07110

W. D. McELROY
Department of Biology, B-022
University of California
San Diego
La Jolla, California 92093

BORIS MAGASANIK
Department of Biology
Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02139

FREDERICK G. NEIDHARDT
Department of Microbiology
6643 Medical Science Bldg. II
University of Michigan Medical School
Ann Arbor, Michigan 48109

W. D. PHILLIPS
Department of Chemistry
Washington University
Box 1134
St. Louis, Missouri 63130

ESMOND E. SNELL
Department of Microbiology
University of Texas
Austin, Texas 78712

ALBERTO SOLS
Instituto de Epidemiologia del S.C.I.C.
Facultad de Medicina
Universidad Autonoma
Herederos de Navas S/N
Madrid 34
Spain

Publishers:
ACADEMIC PRESS, INC.
1250 Sixth Avenue
San Diego, California 92101

Dear Dr. Mora:

Your manuscript has been reviewed and

_____ accepted for publication. A reprint order form will be supplied by the Publisher,
Academic Press, Inc., 1250 Sixth Avenue, San Diego, CA 92101.

is/herewith returned/not acceptable for the following reasons:

_____ not clear as checked in the manuscript.

_____ the manuscript is too long.

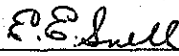
_____ sections of the manuscript which are noted (text, figures, tables) are not suitable
for reproduction by photo-offset. Please resubmit it in accordance with the
Information for Contributors.

Other Comments:

This is a sound and interesting piece of work, but its scope and complexity makes it much more appropriate for publication as a full paper in one of the regular microbiological journals than as a brief, advance note in BBRC.

On behalf of the Editors


F.C. Neidhardt


E.E. Snell

AUTHOR'S COPY

INDICE

	Páginas
Introducción	1 - 9
Objetivo	10 - 11
ω -Amidase Pathway in the Degradation of Glutamine in <u>Neurospora crassa</u>	12 - 14
Glutamine Cycling in <u>Neurospora crassa</u>	15 - 25
Discusión	26 - 31
Conclusiones	32
Bibliografía	33 - 36

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 estas 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. La mayoría de los organismos vivos obtienen su nitrógeno de alguna forma combinada, por ejemplo, nitrato, amonio, o compuestos más complejos como aminoácidos. El glutamato y la glutamina son los productos primarios de la asimilación del nitrógeno debido a que son los únicos puntos en donde se fija el nitrógeno inorgánico en esqueletos de carbono para dar nitrógeno orgánico. Estos aminoácidos ocupan una posición central en el metabolismo intermedio debido a que son los donadores universales del nitrógeno en la célula.

La asimilación del amonio es el punto donde se fija el nitrógeno en moléculas orgánicas y de ahí se distribuye 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 α -cetoglutarato, NADPH y amonio. La GS sintetiza glutamina a partir de glutamato, amonio y ATP.

La GDH de Neurospora crassa es un hexámero constituido por subunidades iguales con un peso molecular de 48,000 (1). Los estudios de Fincham y colaboradores (2, 3, 4, 5, 6) han establecido su estructura oligomérica, su secuencia de aminoácidos y han demostrado una aparente correlación entre los sitios de diferentes mutaciones puntuales y la posición de los aminoácidos en el polipéptido. La actividad de la GDH es ligeramente menor cuando se usa glutamato o glutamina como fuente de nitrógeno que cuando se usa amonio (7). Fincham y colaboradores han descrito mutantes que carecen de la actividad de la GDH. Estas mutantes en comparación con la cepa silvestre presentan una baja velocidad de crecimiento en amonio como fuente de nitrógeno, mientras que la velocidad de crecimiento es casi igual a la de la cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (8). Estos datos indican que la GDH se requiere principalmente para asimilar el amonio cuando éste se encuentra en exceso.

La GS de Neurospora crassa está formada por dos monómeros denominados α y β . Los monómeros α (GS α) se constituyen principalmente en un tetrámero, mientras que los monómeros β (GS β) forman un octámero (9). La GS α tetramérica tiene una mayor afinidad por amonio que la GS β octamérica y su velocidad máxima es 10 veces menor (J. Guzmán y J. Mora, en preparación). Esto concuerda con la presencia de la GS α en condiciones de limitación de amonio y de la GS β en exceso de amonio. Se ha demostrado que en exceso de diferentes fuentes de nitrógeno, tales como amonio, glutamato y glutamina, la actividad de la GS se regula a nivel de la concentración y de la síntesis de novo de esta enzima (10, 11). Se ha establecido que las diferentes síntesis de la GS in vivo corresponden a una diferencia similar en el nivel de RNA mensajero específico que codifica para la enzima (12, 13). La actividad de la GS es alta en glutamato, intermedia en amonio y baja en glutamina(12).

Cuando el micelio de Neurospora crassa se priva de la fuente de carbono se observa una degradación de la GS octamérica, esta degradación es mayor en presencia de glutamina. En este último caso también se observó que la degradación de la GS coincidía con la disminución en el RNA mensajero específico de esta enzima (C. Quinto, R. Palacios y J. Mora, comunicación personal). Si el micelio se priva de la fuente de carbono y de nitrógeno, hay una degradación de la GS y de la proteína total,

que es acompañada de una excreción de amonio al medio de cultivo. Cuando se vuelve a adicionar la fuente de carbono se observa un aumento en la concentración y en la actividad de la GS y una reincorporación del amonio del medio en proteína (14). Se propuso que la degradación de la GS en ausencia de la fuente de carbono es un mecanismo regulatorio que previene la síntesis de la glutamina preservando los esqueletos de carbono y energía para el mantenimiento de la célula (14).

La GS es inhibida por un número de metabolitos de la donación del nitrógeno de la glutamina (15) y de esta manera regula la concentración de la glutamina de acuerdo con las demandas de estos metabolitos.

La glutamina, sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas y además es un correpresor del catabolismo nitrogenado en Neurospora crassa. Debido a que la concentración intracelular de la glutamina es el resultado de su síntesis y degradación y que de ello depende la regulación de la expresión genética de un gran número de enzimas del metabolismo nitrogenado, es importante conocer tanto la síntesis de la glutamina como su asimilación.

En microorganismos eucariotes se conoce como se regula la síntesis de la glutamina. Sin embargo, no se conoce como se degrada este aminoácido, a excepción de la asimilación de la glutamina por transamidación.

Las transamidadasas son enzimas que catalizan la donación del grupo amido de la glutamina a un aceptor, dando como productos el aceptor con un grupo amino y ácido glutámico. La mayoría de estas transamidadasas utilizan ATP. Así, el átomo amido de la glutamina es usado para la síntesis de los átomos de nitrógeno amido del NAD y de la asparagina, los átomos de nitrógeno 3 y 9 del anillo de purina, los grupos aminos de la glucosamina, guanina, citosina, ácido p-aminobenzoico, el átomo de nitrógeno de carbamilo fosfato (que es utilizado para la síntesis de la arginina y el átomo de nitrógeno 1 del anillo de pirimidinas), el átomo de nitrógeno 1 del anillo del imidazol de histidina y el átomo de nitrógeno del pirrol del triptofano (18).

La transamidada más estudiada es la carbamilo fosfato sintetasa de Escherichia coli (19, 20). Esta enzima tiene un peso molecular de 163,000 y está compuesta por dos subunidades, una subunidad pesada de peso molecular de 130,000 y una subunidad ligera de un peso molecular de 40,000. La subunidad pesada tiene los sitios de unión para amonio, bicarbonato, ATP y los efectores alostéricos UMP, IMP, ornitina y amonio. La subunidad ligera tiene el sitio de unión para el grupo γ -glutamilo de la glutamina. Aparentemente las dos subunidades contribuyen a la unión de la glutamina debido a que la subunidad ligera, por separado, tiene una baja afinidad por glutamina. Cuando las subunidades están separadas, la subunidad pesada es capaz de catalizar la síntesis de carbamilo fosfato a partir de amonio pero no a partir de glutamina. La subunidad ligera cataliza la hidrólisis de la glutamina. Los aspectos estructurales y fun--

cionales descritos para la carbamil fosfato sintetasa respecto al sitio de unión a la subunidad ligera son características generales de las transamidadas (21). Así, parece que el grupo amido de la glutamina se une a un sitio que se encuentra cerca de otro que une amonio.

La glutamato sintetasa (GOGAT) es una transamidasa que cataliza la transamidación reductiva de la glutamina con el α -cetoglutarato para dar 2 moléculas de ácido glutámico. 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 alamina deshidrogenasa, crezcan en un medio mínimo (22) 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 (23), 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 GOGAT lleva a cabo la transamidación reductiva de este aminoácido dando dos moléculas de ácido glutámico.

La participación de la GOGAT en hongos filamentosos se demostró por primera vez en Neurospora crassa con base en la observación de que una cepa mutante que carece de la actividad de GDH crece igual que una cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (8). La GOGAT de Neurospora crassa se purificó a homogeneidad. Está constituida por un sólo tipo de monómeros

de peso molecular mayor a 200,000. La actividad de la GOGAT en un medio con amonio es baja, comparada con la actividad en un medio limitado de amonio y se reprime en glutamato y glutamina (24). La mayor actividad de la GOGAT se encuentra en el medio crecido en limitación de amonio. Esto sugiere que la vía de asimilación que opera en limitación de amonio es la GS-GOGAT, aunque no se descarta la posibilidad de que la GDH también participe en la asimilación de amonio en esta condición debido a que se encuentra una apreciable actividad de esta enzima (12).

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 (25). 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 (26). La actividad de la glutaminasa A aumenta cuando el microorganismo entra en fase estacionaria en cultivos que contienen una alta concentración de amonio. Cuando la concentración de amonio es baja, la actividad de esta enzima no aumenta. La actividad de glutaminasa A se eleva cuando se crece a este microorganismo en glutamina como fuente de nitrógeno. La actividad de la glutaminasa B parece ser constitutiva debido a que su actividad no se ve influenciada por la fase

de crecimiento, ni por diferentes condiciones nutricionales. La glutaminasa B es inhibida por nucleosidos tri y difosfatados y es activada por nucleosidos monofosfatados (26).

La transaminasa de glutamina es otra enzima que puede participar en la asimilación de la glutamina. La transaminasa de glutamina cataliza la reacción de transaminación entre glutamina y muy diversos α -cetoácidos. El α -cetoácido de la glutamina (α -cetoglutaramato) es hidrolizado por una ω -amidasa a α -cetoglutarato y amonio. La transaminasa de glutamina a diferencia de otras transaminasas, es irreversible in vivo debido a que uno de los productos de esta reacción, el α -cetoglutaramato, no se acumula porque es hidrolizado por la ω -amidasa (27). El estudio de la transaminasa de glutamina se ha realizado en tejidos de mamíferos y se ha encontrado que en los tejidos de rata hay por lo menos tres diferentes transaminasas de glutamina (28): 1). La transaminasa de glutamina L soluble, cuyos mejores sustratos son la glutamina, la metionina, el α -ceto- γ -metiol butirato, el β -mercapto piruvato y el glioxalato. 2). La transaminasa de glutamina K soluble, cuyos mejores sustratos son: la glutamina, la fenilalanina y los correspondientes α -cetoácidos. 3). La transaminasa de glutamina K mitocondrial que difiere de la transaminasa K soluble en ciertas propiedades físicas. Se ha encontrado actividad de transaminasa de glutamina en tejidos de mamíferos (27), en ciertas plantas superiores (29), en bacterias (30) y en insectos (31). La actividad de ω -amidasa

ha sido encontrada en tejidos de mamíferos, levadura, Escherichia coli, Streptococcus faecalis, hojas de espinacas y - -
hojas de lechuga (27).

Otras enzimas que podrían participar en la degradación de la glutamina son las L-aminoácido oxidasas, que 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 (32).

La L-aminoácido oxidasa se encuentra presente tanto en extractos de Neurospora crassa como en el medio de cultivo. La síntesis de esta enzima requiere tanto de la inducción por un aminoácido, así, como simultáneamente de la de-represión catabólica nitrogenada (23). 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 (23).

OBJETIVO.

En estudios sobre el metabolismo nitrogenado en Neuros pora crassa, en condiciones en las cuales que se restringe el crecimiento de este hongo, se encontró que existe una acumulación de algunos aminoácidos como arginina y glutamina al disminuir el crecimiento exponencial (34) o en ausencia de crecimiento, como sucede en conidias de cepas auxótrofas privadas del aminoácido que requieren (35, 36). La acumulación de estos aminoácidos es paralela a un aumento en la actividad específica de la GS que, por lo menos en un caso, involucra la síntesis de novo de la enzima (36). Cepas mutantes en las enzimas que asimilan amonio no utilizan la glutamina del medio para la síntesis de los aminoácidos que se acumulan. Así, en presencia de glutamina como fuente de nitrógeno, cepas mutantes que carecen de la actividad de la GDH y la GOGAT excretan amonio al medio de cultivo, lo que indica que la glutamina es degradada a amonio. Se dedujo que para que la acumulación de arginina se lleve a cabo se requiere resintetizar la glutamina, debido a que los auxótrofos de glutamina acumulan el glutamato en vez de la arginina en glutamina como fuente de nitrógeno (36).

Para explicar estos efectos, se propuso que la glutamina que entra a la célula es degradada a nitrógeno inorgánico y esqueletos de carbono, los cuales son reasimilados en glutamato y glutamina que se requieren para la síntesis de arginina y -

otros aminoácidos (36). Se propuso que la degradación y la resíntesis de la glutamina dan origen a la operación de un ciclo. El primer paso de este ciclo consiste en la síntesis de diferentes aminoácidos por medio de una transaminación con glutamina, el segundo paso es la hidrólisis del α -cetoglutarato a α -cetoglutarato y amonio por una ω -amidasa, el tercer paso es la utilización de estos productos por la deshidrogenasa glutámica biosintética para formar ácido glutámico y el cuarto paso está dado por la resíntesis de glutamina a través de la glutamino sintetasa.

El objetivo de este trabajo es demostrar que vías participan en la asimilación de la glutamina en Neurospora crassa cuando este aminoácido se utiliza como fuente de nitrógeno. - Esto permitirá conocer como se distribuye el nitrógeno y el carbono de este aminoácido.

ω -Amidase Pathway in the Degradation of Glutamine in *Neurospora crassa*

JORGE CALDERÓN, ENRIQUE MORETT, AND JAIME MORA

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D.F.

Received 28 September 1984/Accepted 6 November 1984

Evidence for the participation of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway in the utilization of glutamine in *Neurospora crassa* was obtained. Its participation is indicated by (i) the *in vitro* activities of glutamine transaminase and ω -amidase, (ii) the *in vivo* accumulation of α -ketoglutarate when an inhibitor of transaminases is present, and (iii) the inhibition by aminoxyacetic acid and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine of the ammonium excreted in the presence of glutamine by a mutant strain that lacks glutamate dehydrogenase and glutamate synthase.

Glutamine has a central role in nitrogen metabolism in microorganisms. It is used as a donor of amido nitrogen in transamination reactions, and it is also a corepressor of nitrogen catabolism (15, 19).

We studied the enzymes that participate in glutamate and glutamine synthesis in *Neurospora crassa*: glutamate dehydrogenase (GDH) (NADPH dependent, E.C.1.4.1.4) (10), glutamate synthase (GOGAT) (NADH dependent, E.C.1.4.7.1) (12, 13), and glutamine synthetase (E.C.6.3.1.2) (17).

We reported that glutamine, arginine, and other amino acids are accumulated when *N. crassa* is deprived of an amino acid or at the end of exponential growth (6, 18). Mutant strains impaired in the assimilation of ammonium (5, 8) are unable to use the nitrogen atoms of ammonium or glutamine for arginine synthesis (7). To explain the effect of these mutations, we proposed that glutamine is first degraded to ammonium and α -ketoglutarate, which are sequentially converted to glutamic acid, glutamine, and arginine (7).

Evidence for the degradation of glutamine by the ω -amidase pathway in other cell systems has been amply documented by Cooper and Meister (3, 4). In this pathway glutamine is transaminated to yield different amino acids and α -ketoglutarate through the participation of a glutamine transaminase; subsequently, the α -ketoglutarate is hydrolyzed to α -ketoglutarate and ammonium by the action of an ω -amidase. Since the presence of a glutamine transaminase had been reported in *N. crassa* (16), we suggested the operation of the ω -amidase pathway in this fungi (7). In this paper we present evidence of the operation of glutamine transaminase and ω -amidase as the enzymes responsible for the conversion of glutamine to α -amino nitrogen, ammonium, and carbon skeletons.

Glutamine transaminase and ω -amidase activities were determined in cell-free extracts from *N. crassa* wild-type strain (74-A) cultures grown on Vogel minimal medium (21) supplemented with 1.5% sucrose at 30°C with shaking at 250 rpm.

For glutamine transaminase activity cell-free extracts were prepared from acetone powders (20) homogenized in extraction buffer (50 mM PPi, pH 8.5); the homogenates were centrifuged and dialyzed. The stoichiometry of glutamine transaminase activity is shown in Table 1. The reaction mixture was incubated for 10 min at 37°C (see Table 1); the disappearance of the substrate phenylpyruvate (1) and the formation of the product phenylalanine (7) were determined

as reported. The formation of α -ketoglutarate was also measured quantitatively by a modification of the method described by Cooper et al. (2). The transaminase was measured in the presence of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), an inhibitor of the ω -amidase activity, which allows optimal accumulation of α -ketoglutarate (Table 1; see below). When [14 C]glutamine and phenylpyruvate were used as substrates in the presence of DON, the label incorporated into α -ketoglutarate (1.9 μ mol) corresponded to the α -ketoglutarate measured colorimetrically (2.0 μ mol). The activity and stoichiometry of glutamine transaminase was also assayed as reported by Monder and Meister (16) with glutamine and α -ketosuccinamate as substrates. These authors found that in *N. crassa* only glutamine functions as an α -amino donor with α -ketosuccinamate. The specific activity with α -ketosuccinamate was similar to that assayed with phenylpyruvate (Table 1), and the amount of α -ketoglutarate formed was the same with and without DON (data not shown). Only one transaminase was apparently involved in both assays, since the activities were not additive in the presence of both α -ketoacids (Table 1).

For the ω -amidase activity the extraction buffer used contained 0.1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 50 mM Tris-hydrochloride (pH 8.5). The stoichiometry of ω -amidase activity is shown in Table 2. The incubation mixture (Table 2) was incubated for 30 min at 37°C, and the reaction was stopped with 0.1 ml of 17% trichloroacetic acid. After the supernatant was neutralized with NaOH, ammonium and α -ketoglutarate were determined as described (11, 22). DON completely inhibited the ω -amidase activity, and aminoxyacetic acid (AOA) did not have any effect on it. Since α -ketosuccinamate is an inhibitor of the ω -amidase activity and not a substrate (Table 2), the α -ketoglutarate formed by the transamination of glutamine with this α -ketoacid could be detected in the absence of DON. The specific activity of *N. crassa* ω -amidase was threefold higher than the glutamine transaminase activity, and it was twofold lower than the highest value of ω -amidase activity reported for animal cells (3). We found that the ω -amidase from animal cells was also inhibited by DON (data not shown).

The presence of α -ketoglutarate *in vivo* was tested from *Neurospora* wild-type strain conidia or mycelia incubated for 5 h on either ammonium or glutamine as nitrogen sources. Samples were prepared by homogenizing recently harvested conidia or mycelium in 80% (vol/vol) ethanol. The homogenates were filtered, lyophilized, resuspended in wa-

b NOTES

TABLE 1a Stoichiometry of *N. crassa* glutamine transaminase with phenylpyruvate

Assay condition	Sp act ^a	Change of concn (nmol)		
		Phenylpyruvate	Phenylalanine	α -Ketoglutarate
Complete system ^b	5.5	-205.0	+219.4	+205.7
Without glutamine	0.6	-21.8	+17.4	ND ^c
Without phenylpyruvate	ND	ND	ND	ND
Without extract	ND	ND	ND	ND
Without DON	5.5	-205.0	+219.4	+86.2
With 10 mM AOA	ND	ND	ND	ND
With α -ketosuccinamate, without phenylpyruvate	6.0 ^d			+223.1
With α -ketosuccinamate	6.0 ^d			+222.0

^a Expressed as nanomoles of phenylpyruvate per minute per milligram of protein.

^b The assay mixture contained (in 1.0 ml) 20 mM glutamine, 0.4 mM phenylpyruvate or 0.8 mM α -ketosuccinamate, 0.2 mM pyridoxal phosphate, 150 mM sodium borate buffer (pH 8.5), 0.3 mM DON, and 3.7 mg of dialyzed protein extract.

^c ND, Not detected.

^d Expressed as nanomoles of α -ketoglutarate per minute per milligram of protein.

fer, and applied to a Dowex 50 column (H⁺ form; 7 by 0.5 cm). The column was eluted with 10 ml of water, and the effluent was added to a Dowex-2 column (Cl⁻ form; 4 by 0.5 cm). After the column was washed with water, the ketoacid was eluted with 0.1 N HCl. The fractions were neutralized and lyophilized and the α -ketoglutarate was determined as described above. The α -ketoglutarate was only detected in the presence of 1 mM DON, and it was fivefold higher on glutamine (10 μ mol/h per mg of protein) than on ammonium as the nitrogen source. When 10 mM AOA and 1 mM DON were present in the medium, no α -ketoglutarate was found, and the activities of glutamine transaminase and ω -amidase determined *in vitro* were also found to be completely inhibited. The *in vivo* accumulation of α -ketoglutarate in the presence of DON and its absence in the presence of AOA and DON indicate that the ω -amidase pathway participates in glutamine degradation.

The proposal that in *N. crassa* glutamine is degraded to ammonium by the operation of the ω -amidase pathway and

TABLE 2a Stoichiometry of ω -amidase

Assay conditions	Sp act ^a	Change of concn (μ mol)		
		α -Ketoglutarate	α -Ketoglutarate	Ammonium
Complete system ^b	15.5	-1.43	+1.43	+1.58
Without α -ketoglutarate	0.7	ND ^c	ND	0.07
Without extract	ND	ND	ND	ND
With 0.3 mM DON	0.7	ND	ND	+0.07
With 10 mM AOA	12.0	-1.12	-	+1.22
With 10 mM α -ketosuccinamate	3.8 ^d		+0.39	

^a Expressed as nanomoles of ammonium per minute per milligram of protein.

^b The assay mixture contained (in 1.0 ml) 10 mM α -ketoglutarate, 2 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris-hydrochloride buffer (pH 8.5), and 3.4 mg of dialyzed protein extract.

^c ND, Not detected.

^d AOA interfered with the determination of α -ketoglutarate.

^e Expressed as nanomoles of α -ketoglutarate per minute per milligram of protein.

J. BACTERIOL.

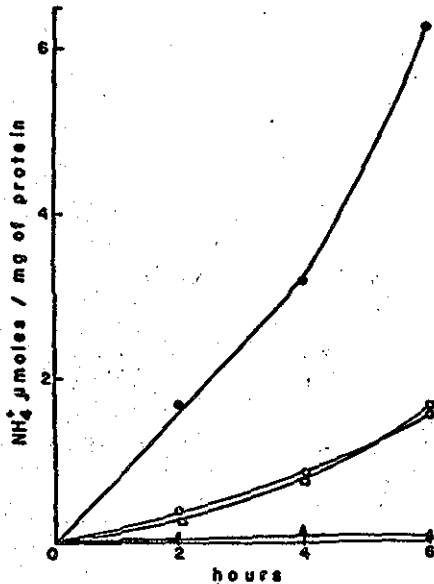


FIG. 1a Inhibition by AOA and DON of ammonium excretion by the double-mutant strain lacking GDH and GOGAT activities in glutamine as nitrogen source. Conidia of the GDH⁻ GOGAT⁻ mutant strain were germinated for 6 h in a medium supplemented with 10 mM alanine as nitrogen source. The mycelium was collected and transferred to different media: 10 mM glutamine (●), 10 mM glutamine plus 25 mM AOA (□), 10 mM glutamine plus 1 mM DON (△), and without nitrogen (○).

that this ammonium could be reassimilated predicts that a mutant which lacks GDH activity might excrete ammonium to the medium when grown on glutamine as nitrogen source.

After 6 h of growth on 1 mM glutamine, the culture medium of the mutant lacking GDH activity contained 0.25 mM of ammonium, whereas only 0.02 mM ammonium was present in the wild-type strain culture. The ammonium in the medium was measured as described (7). The ammonium excreted by the G mutant lacking GDH in the presence of glutamine is the result of the lack of GDH activity and of the operation of the ω -amidase pathway enzymes. The latter is shown by the *in vivo* effect of inhibitors of ammonium excretion from glutamine in the double-mutant strain lacking GDH and GOGAT (Fig. 1). This mutant strain was used to prevent glutamine assimilation by GOGAT (manuscript in preparation). As shown in Fig. 1, AOA inhibits the liberation of ammonium from glutamine, and DON has a similar and more powerful effect, since it completely abolishes the production of ammonium, including the small amount of ammonium excreted in the absence of nitrogen.

We demonstrated the presence of a transaminase activity between glutamine and phenylpyruvate that leads to the formation of phenylalanine and α -ketoglutarate (Table 1), and we detected an ω -amidase that hydrolyzes α -ketoglutarate into α -ketoglutarate and ammonium (Table 2). We

have also shown that the ω -amidase pathway has a role in the degradation of glutamine.

In contrast with other microorganisms (14), *N. crassa* assimilates glutamine through enzymes which do not include the participation of a glutaminase. It should be mentioned that the glutamine transaminase must be considered as an irreversible transaminase, since the α -ketoglutarate formed in this reaction could be either hydrolyzed by the ω -amidase or spontaneously cyclize (3).

We are grateful to M. en C. Georgina Hernández for her critical review of the manuscript and to María Elena Valázquez for her technical assistance.

The work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zebada.

LITERATURE CITED

- Cooper, A. J. L. 1978. Purification of soluble and Mitochondrial glutamine transaminase K from rat kidney. *Anal. Biochem.* 89:451-460.
- Cooper, A. J. L., A. K. Dhar, H. Kutt, and T. E. Duffy. 1980. Determination of 2-pyrrolidone-5-carboxylic and α -ketoglutaric acids in human cerebrospinal fluid by gas chromatography. *Anal. Biochem.* 103:118-126.
- Cooper, A. J. L., and A. Melster. 1977. The glutamine transaminase- ω -amidase pathway. *Crit. Rev. Biochem.* 4: 281-303.
- Cooper, A. J. L., and A. Melster. 1981. Comparative studies of glutamine transaminase from rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B:137-145.
- Dávila, G., F. Sánchez, R. Palacios, and J. Mora. 1978. Genetics and physiology of *Neurospora crassa* glutamine auxotrophs. *J. Bacteriol.* 134:693-698.
- Espin, G., and J. Mora. 1978. Effect of the deprivation of amino acids on conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 104:233-240.
- Espin, G., R. Palacios, and J. Mora. 1979. Glutamine metabolism in nitrogen-starved conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 115:59-68.
- Fincham, J. R. S. 1950. Mutant strains of *Neurospora* deficient in aminating ability. *J. Biol. Chem.* 182:61-73.
- González, A., M. Tenorio, G. Vaca, and J. Mora. 1983. *Neurospora crassa* mutant impaired in glutamine regulation. *J. Bacteriol.* 155:1-7.
- Herrández, G., R. Sánchez-Pescador, R. Palacios, and J. Mora. 1983. Nitrogen source regulates glutamate dehydrogenase NADP synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 154:524-528.
- Hirsck-Koh, H., and D. M. Greenberg. 1971. Phosphoserine amino-transferase (sheep brain). *Methods Enzymol.* 17:331-334.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:127-133.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.
- Imada, A., S. Igarashi, K. Nakahama, and M. Isono. 1973. Asparaginase and glutaminase activities in microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 76:85-99.
- Marzluf, G. A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 45:437-461.
- Monder, C., and A. Melster. 1958. α -Ketoglutaric acid as a product of enzymatic transamination of glutamine in *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta.* 28:202-203.
- Mora, J., G. Dávila, G. Espin, A. González, J. Guzmán, G. Hernández, G. Hummelt, M. Lara, E. Martínez, Y. Mora, and D. Romero. 1980. Glutamine metabolism in *Neurospora crassa*, p. 183-211. In J. Mora, and R. Palacios (ed.). *Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation*. Academic Press, Inc., New York.
- Mora, Y., G. Espin, K. Williams, and J. Mora. 1978. Nitrogen accumulation in mycelium of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 104:241-250.
- Vaca, G., and J. Mora. 1977. Nitrogen regulation of arginase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 131:719-725.
- Vichildo, I., Y. Mora, Quinto, R. Palacios, and J. Mora. 1978. Nitrogen regulation of glutamine synthetase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 106:251-259.
- Vogel, H. J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 98:435-446.
- White, C. 1970. The determination of NH_3 with the use of glutamic dehydrogenase. *Methods Enzymol.* 17:955.

GLUTAMINE CYCLING IN *Neurospora crassa*

Jorge Calderón and Jaime Mora
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.

SUMMARY.

Neurospora crassa glutamate synthase and glutamate deshydrogenase play an important role in glutamate synthesis when glutamine is used as nitrogen source; this was concluded by using mutant strains lacking those enzyme activities. Also, we found that when growing on glutamine as nitrogen source this amino acid is degraded and resynthesized, giving rise to glutamine cycling that seems to be essential for cell growth.

INTRODUCTION.

Glutamine is the final product of ammonium assimilation and also it is an amido nitrogen donor for biosynthetic reactions. A great number of reports give evidence that glutamine is the nitrogen metabolite responsible for nitrogen catabolite repression (1,2). Besides glutamine role in the distribution of nitrogen by transamidation reactions (3), another information of how carbon and nitrogen from glutamine are assimilated in eucariote microorganisms is scarce. In this regard we have described the operation of the ω -amidase pathway that converts glutamine to α -ketoglutarate and ammonium through the action of a glutamine transaminase and an ω -amidase (4). In addition, we have found that NADP-dependent glutamate dehydrogenase participates in the assimilation of ammonium liberated by the ω -amidase pathway (4). Glutamate synthase (GOGAT) can also contribute to glutamine nitrogen distribution; an NADH-dependent GOGAT has been found in *N. crassa* (5).

It is known that in *N. crassa* glutamine represses its own synthesis as result of a change on concentration of glutamine synthetase (GS) specific mRNA (6). However, since a sizeable activity of GS remains in cells grown on glutamine excess (7), it seems possible that in this condition glutamine synthesis is not completely suppressed.

Taking all this facts together we decided to study how glutamine is as-

simulated as nitrogen source in *N. crassa*, comparing its assimilation in the wild type strain and in mutant strains lacking the activity of enzymes involved in ammonium assimilation.

MATERIAL AND METHODS.

Strains.- All stocks came from the collection of J. Mora and from the Fungal Genetics Stock Center at the Humboldt State University Foundation, Arcata, Calif. The basic stocks were the wild type strain 74-A; the *am-1* strain, deficient in glutamic acid dehydrogenase (*GDH*⁻) (8); the *en-am-2* strain, deficient in glutamate synthase (*GOGAT*⁻) (9); the *gln-1a* strain, partially deficient in glutamine synthetase activity (*GS*[±]) (10), the double mutant strain *en-am-2;am-1* (*GOGAT*⁻; *GDH*⁻) and the double mutant strain *am-1;gln-1a* (*GDH*⁻; *GS*[±]).

Growth conditions.- Batch cultures of *N. crassa* were grown on Vogel minimal medium (11) supplemented with 1.5% sucrose at 30°C with shaking at 250 rpm. The conidia used as inoculum were obtained as previously reported (7). The nitrogen source was glutamine as indicated in the text. Glutamine limitation in fed-batch cultures was achieved by pumping glutamine at a dilution rate of 0.015 $\mu\text{mol ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ into aerated Florence flasks held at 30°C containing Vogel medium lacking nitrogen. Growth was determined as described (7).

Determination of metabolites.- The intracellular content of amino acids and the ammonium in the medium was determined as described (12).

Amino acid labeling with [U-¹⁴C]sucrose.- Conidia of the wild type strain or the *gln-1a* strain were germinated for 7.5 hours in a medium supplemented with 5 mM glutamine and 1.5% sucrose. The mycelia was collected by filtration and transferred to a medium containing 5 mM glutamine, 0.06% sucrose and 0.17mCi/ml [U-¹⁴C] sucrose. After 90 min, of incubation the mycelium was collected, the amino acid content was determined as reported (12) and the radioactivity incorporated in each amino acid was determined in a liquid scintillation counter.

Determination of enzymes activities.- *GOGAT* (5) and *GS* activities were assayed as described previously (6).

RESULTS.

Glutamine assimilation by *GOGAT*.- We have reported that the *GDH* activity participate in the assimilation of the ammonium liberated from glutamine by the ω -amidase pathway when this aminoacid was used as nitrogen source as indicated by the ammonium excretion in *GDH*⁻ mutant strain (4).

A double mutant strain lacking *GDH* and *GOGAT* activities excreted higher amounts of ammonium in glutamine as nitrogen source than the single mutant strain *GDH*⁻ on glutamine (Fig. 1). This indicates that in this condition *GOGAT*

through the participation in glutamate synthesis has an indirect role in the assimilation of ammonium, by GS. When compared with the wild type strain the GOGAT mutant strain accumulates glutamine and has low content of glutamate and alanine on glutamine as nitrogen source and this supports the participation of GOGAT in glutamine assimilation (Fig. 1). The mutant strain GDH^- accumulates a certain amount of glutamine and although glutamate is elevated, alanine is low (Fig. 1). These effects are more apparent in the double mutant strain $GOGAT^-;GDH^-$ that accumulates 100-fold higher glutamine than the wild type strain, however glutamate and alanine are found in very low amounts (Fig. 1). The $GOGAT^-;GDH^-$ double mutant strain has half of the wild type strain growth rate on glutamine and it grows optimally in alanine and other amino acids that can synthesize glutamate by transamination (data not shown). From these experiments we conclude that GOGAT quantitatively plays a very important role in the exogenous conversion of glutamine to glutamate and that GDH, through the fixation of the ammonium liberated by the ω -amidase pathway (4), also contributes to glutamate synthesis.

Glutamine resynthesis.- In comparison with GDH^- mutant strain the double mutant strain $GDH^-;GS^+$ excretes higher amounts of ammonium on glutamine as nitrogen source (Fig. 1). This result indicates that GS also participates in the assimilation of ammonium liberated from glutamine. Accordingly, in comparison with the wild type strain a single mutant strain partially lacking GS has a similar low glutamine content, but high content of glutamate and alanine (Fig. 1). As expected, the presence of the GDH^- mutation in a GS^+ background decreases glutamate and alanine (Fig. 1). These data together with the lowest glutamine content in the $GDH^-;GS^+$ mutant strain (Fig. 1) can be explained as the result of the ω -amidase pathway operation that liberates ammonium which can not be assimilated neither in glutamate nor in glutamine. We conclude that exogenous glutamine is being converted to glutamate and this amino acid is subsequently

used for glutamine synthesis.

To determine the amount of ammonium liberated from glutamine degradation by the ω -amidase pathway which is assimilated by the GDH and GS we measured the amount of glutamine incorporated into the cell and the concentration of ammonium liberated by the double mutant strain $GOGAT^-GDH^-$. This strain does not assimilate glutamine by GOGAT and is impaired in glutamine synthesis (see above). It was found that during the first 3 h one fifth of the nitrogen from the incorporated glutamine was liberated as ammonium and from 9 to 15 h half of the nitrogen was excreted (Table I).

The synthesis of glutamine in the presence of this amino acid as nitrogen source was directly demonstrated by incubating a *N. crassa* wild type strain with [^{14}C] sucrose. Table II shows that glutamate and glutamine are labeled as well as other amino acids like alanine and aspartate. The specific radioactivity of glutamate and glutamine was about two-fold lower than that of aspartate and alanine, this is possibly due to the dilution by the respective non labeled amino acid. A 9-fold decrease in the radioactivity incorporated on glutamine and a 4-fold decrease in its specific radio activity were observed in a mutant strain that partially lacks GS activity. These data indicate that the labeled α -ketoglutarate that comes from the oxidation of the [^{14}C] sucrose is sequentially converted to glutamate and glutamine. A different result would be obtained if the glutamine incorporated into the cell was enough to supply all of its requirements and no glutamine synthesis was necessary. In this case the prediction would be that no label incorporated in glutamine should be found.

Although the GS^+ mutant strain grows as well as the wild type strain on glutamine excess this mutant grows poorly on limited glutamine fed-batch

cultures (Fig. 2). However, after 12 h of growth the GS^+ mutant strain grows well (Fig. 2). We have found that after 24 h of growth this mutant has a four-fold higher GS synthetase specific activity compared with the activity present at 12 h of growth. Then, glutamine synthesis is required for growth even in the presence of exogenous glutamine.

DISCUSSION.

GOGAT plays an important role in the assimilation of glutamine nitrogen as indicated by: a) the accumulation of glutamine and the lower content of glutamate and alanine in a $GOGAT^-$ mutant strain, b) a higher accumulation of glutamine, a lower content of glutamate and alanine and a higher excretion of ammonium in the $GOGAT^-;GDH^-$ mutant strain in comparison with the GDH^- mutant strain, and c) the low growth rate of $GOGAT^-;GDH^-$ mutant strain on glutamine and its high growth rate on alanine and other amino acids which efficiently gives glutamate.

The high amount of glutamine found in the $GOGAT^-;GDH^-$ mutant strain can be explained by the glutamate limitation that possibly impairs glutamine distribution since both nitrogen donors are required in some biosynthetic pathways. The slow growth on glutamine of $GOGAT^-;GDH^-$ mutant strain is the result of its inability to synthesize glutamate by GOGAT and GDH.

The ammonium liberated from glutamine by the ω -amidase is assimilated by GDH (4) and GS as indicated by: a) the higher excretion of ammonium in the $GDH^-;GS^-$ mutant strain in comparison with the GDH^- mutant strain, b) the accumulation of glutamate and alanine in the GS^+ mutant strain and c) the labeling of glutamine in the presence of [^{14}C] sucrose in the wild type strain and d) the decrease in the labeling of glutamine in the GS^+ mutant strain.

The excretion as ammonium of half of the nitrogen of the glutamine incorporated in the $GOGAT^-;GDH^-$ mutant strain indicates that a great proportion

of the glutamine is degraded to inorganic nitrogen and it is assimilated again to organic nitrogen by GDH and GS. This explains why the GOGAT⁻ single mutant strain does not excrete ammonium on glutamine as nitrogen source.

We have shown that in order to assimilate glutamine as nitrogen source it is necessary to convert this amino acid to glutamate, the other nitrogen donor.

As demonstrated here the contribution of other transamidases different from GOGAT in the assimilation of glutamine into glutamate, when the former is the nitrogen source, must be a minor one, then, the action of GOGAT and the incorporation of the ammonium liberated by the ω -amidase pathway through GDH becomes essential.

Glutamine synthesis is required in the presence of glutamine as nitrogen source as indicated by the direct correlation found on limited glutamine between growth and GS activity in GS[±] mutant strain. It is known that the GS[±] mutant strain has a normal α polypeptide and an altered β polypeptide which inactivates GS activity by forming an abnormal hybrid nonfunctional oligomer (10). This can explain the low GS activity found on GS[±] glutamine culture at 12 h of growth. Because it has been found that *N. crassa* expresses preferentially the α -polypeptide on nitrogen limitation (6) the elevation of GS activity found after 12 h growth may be due to the absence of enough altered β polypeptide to inactivate all the α polypeptide synthesized.

The glutamine cycling also operates in ammonium as nitrogen source as indicated the presence of α -ketoglutaramate in this condition. Furthermore, we have found that a mutant strain which lacks asparagine synthetase activity grows on α -ketosuccinamate, the α -ketoacid of asparagine, as result of being aminated by glutamine transaminase (data not shown). In this relation there is a study of ¹³N-tracer on the ammonia assimilation in *B. megaterium* and *E. coli*

under starvation where it has been found a high ammonium nitrogen turnover (13).

The cycling of glutamine in *Neurospora crassa* may fulfill several functions besides contributing to the irreversibility of glutamine transamination (14). Because glutamine is a nitrogen donor and also a corepressor of nitrogen metabolism (2), its turnover may be a way to rapidly regulate its intracellular concentration (15). In doing so, *Neurospora* can quickly govern the rate of synthesis and degradation of cellular nitrogen. In addition the turnover of glutamine may be a general way to take up or liberate the carbon present in organic nitrogenous metabolites. Finally the turnover of glutamine to glutamate and other amino acids is a way to maintain the optimal balance of the nitrogenous compounds (14).

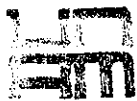
ACKNOWLEDGEMENTS: We are grateful to Georgina Hernández for her critical review of the manuscript, to Gisela Du Pont for the amino acids determination and to Maria Elena Velázquez for her technical assistance. The work was supported in part by grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

REFERENCES.

- 1.- Vaca, G. and Mora, J. (1977). *J. Bacteriol.* 131:755-767.
- 2.- Marzluf, G.A. (1981). *Microbiol. Rev.* 45:437-461.
- 3.- Pursiner, S., and Stadtman, E.R. (1973). The enzymes of glutamine metabolism, p p. 319-573, Academic Press, Inc., New York.
- 4.- Calderón, J., Morett, E., and Mora, J., (1984). *J. Bacteriol.* In press.
- 5.- Hummelt, G., and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:127-133
- 6.- Lara, M., Blanco, L., Campomanes, M., Calva, E., and Mora, J. (1982). *J. Bacteriol.* 150:105-112.
- 7.- Vichido, I., Mora, Y., Quinto, C., Palacios, R., and Mora, J., (1978). *J. Gen. Microbiol.* 106:251-259.
- 8.- Fincham, J.R.S. (1950). *J. Biol. Chem.* 182:61-73.
- 9.- Hummelt, G. and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1688-1694.
- 10.- Dávila, G., Brom, S., Mora, Y., Palacios, R., and Mora, J. (1983). *J. Bacteriol.* 156:993-1000.
- 11.- Vogel, H.J. (1964). *Am. Nat.* 98:435-446.
- 12.- Espín, G., Palacios, R., and Mora, J. (1979). *J. Gen. Microbiol.* 115:59-68
- 13.- Choong-Hyun, Kim and Hollocher, T., H. (1982). *J. Bacteriol.* 151:358-366.
- 14.- Cooper, A.J.L. and Meister, A. (1977). *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 4:281-303.
- 15.- Atkinson, D.E. (1977). Cellular energy metabolism and its regulation. p p. 31-83, Academic Press, New York.

INSTRUCTIVO PARA LLENAR LA FORMA DE REGISTRO DE TESIS

1. Consigne la información de manera clara, de acuerdo a las instrucciones que aquí se señalan. Escriba con tinta.
2. No invada las zonas sombreadas. Tales espacios están reservados a la codificación de la información que usted proporciona.
3. **AÑO EN QUE SE PRESENTA LA TESIS:** Consigne solamente el año (omita el día y el mes); utilice para ello caracteres numéricos únicamente.
4. **AUTOR:** Escriba el nombre del autor en el siguiente orden: apellido paterno, apellido materno y nombre o nombres. Si la tesis ha sido elaborada por más de tres personas, consigne el nombre de las tres primeras en la hoja principal de registro de tesis y solicite una hoja anexa para registrar el nombre de las restantes.
5. **TITULO DE LA TESIS:** Escríbalo tal y como aparece en la portada de la tesis. En caso de haberlo, anexe el subtítulo en el renglón destinado a tal efecto.
6. **LUGAR DE EDICION:** Indique la ciudad donde fue presentada la tesis en examen profesional. No se considera lugar de edición la ciudad donde fue impresa la tesis.
7. **NUMERO DE PAGINAS:** Anote el último número que aparezca impreso en la paginación del ejemplar que presente.
8. **ILUSTRACIONES:** Si su tesis cuenta con algún tipo de ilustraciones (mapas, esquemas, diagramas, fotografías, etc.) tache la palabra "SI". Tache en caso contrario la palabra "NO".
9. **IDIOMA:** Indique el idioma en el que fue redactada la tesis sólo en el caso de que sea éste una lengua distinta al castellano. Si su tesis está escrita en español, ignore el renglón correspondiente a idioma y déjelo en blanco.
10. **GRADO ACADEMICO:** Tache la letra que corresponda al grado académico que obtiene mediante la presentación de la tesis: L para licenciatura, M para maestría, D para doctorado y E para especialización.
11. **CARRERA:** Escriba el nombre completo de la carrera objeto de la tesis de acuerdo a su denominación oficial en los planes de estudio de la universidad en la que la cursó. No utilice abreviaturas.
12. **FACULTAD O ESCUELA:** Anote el nombre completo oficial de la facultad a la que corresponda la tesis. No utilice abreviaturas.
13. **UNIVERSIDAD:** Si su tesis fue presentada en alguna facultad o escuela de la U. N. A. M., deje en blanco este renglón. En caso contrario, consigne el nombre completo y oficial de la universidad a la que pertenece la facultad en la que presentó la tesis.
14. **TEMAS DE QUE TRATA LA TESIS:** Anote los temas que más claramente definan el objeto de la investigación. *Consígnelos de manera clara y concisa por orden de importancia.*
15. **GRADO ACADEMICO DEL ASESOR DE LA TESIS:** Indíquelo -en caso de saberlo- de la misma manera que se pide en el punto 10 de este instructivo.
16. **NOMBRE DEL ASESOR DE LA TESIS:** Escríbalo en el siguiente orden: nombre(s), apellido paterno y apellido materno.
17. **RESUMEN:** Si la tesis que registra corresponde al nivel de doctorado, solicite hoja anexa para redactar un resumen no mayor de una cuartilla. Dicho resumen deberá presentarse -de preferencia- en inglés.



Fecha	i	idioma	g	clave U.	N° de matriz	f. cat.	iden	Registro de Tesis
\$050								1985 Año en que se presenta la tesis:
\$100		Autor:	Calderón		Jiménez			Jorge Fernando
\$100			Apellido paterno		Apellido materno			Nombre(s)
\$100		Autor:						
\$100			Apellido paterno		Apellido materno			Nombre(s)
\$2451		Título:						La Asimilación de la Glutamina en <u>Neurospora crassa</u>
		Subtítulo:						
\$260		Lugar de Edición:	Cuernavaca Morelos					
\$300		Número de páginas:	36	Ilustraciones:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	Idioma:	Español
Grado:	L	<input checked="" type="checkbox"/> D	E	Carrera:	Maestría en Investigación Biomédica Básica			
Facultad o escuela:	Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del CCH							
Universidad:								
Temas que trata la tesis:	La Asimilación de la Glutamina en <u>Neurospora crassa</u>							
Grado del asesor de tesis:	L	M	<input checked="" type="checkbox"/> E	Nombre del asesor:	Dr. Jaime Mora Celis			
\$650								
\$600								
\$901								

TABLE Ib- Glutamine uptake and ammonium excretion in *GOGAT*⁻*GDH* mutant strain

Time hours	glutamine μ moles/ml	ammonium μ moles/ml
3	0.23	0.09
6	0.44	0.28
9	0.50	0.62
12	0.80	0.78
15	0.85	0.88

The nitrogen source was 1 mM glutamine.

TABLE IIb Distribution of ¹⁴C label of sucrose into amino acids in the 74-A strain and the *GS*⁺ mutant strain in glutamine as nitrogen source

Strain	Amino acid	Radioactivity kcpm/mg of protein (1)	Content of amino acid μ mole/mg of protein (2)	Specific radioactivity kcpm/ μ mol of amino acid (1)/(2)
74-A	Aspartate	165.7	0.029	5657.5
	Glutamate	427.6	0.144	2968.0
	Glutamine	279.5	0.144	1941.0
	Alanine	795.0	0.168	4732.0
<i>GS</i> ⁺	Aspartate	127.1	0.019	6760.5
	Glutamate	307.0	0.188	1633.0
	Glutamine	31.2	0.073	429.8
	Alanine	1472.2	0.132	11153.0

The nitrogen source was 5 mM glutamine. For other details see Methods.

FIGURE LEGENDS.

Fig. 1.- Amino acids, intracellular content and ammonium excretion from mutants strains impaired in ammonium fixation. The cultures were grown for 6 hours on 1 mM glutamine. Glutamine (□), glutamate (▣), alanine (▤) and extracellular ammonium (■).

Fig. 2.- Glutamine limitation in fed-batch cultures. Growth cultures of the wild-type strain (●) and the GS^+ mutant strain (▲).

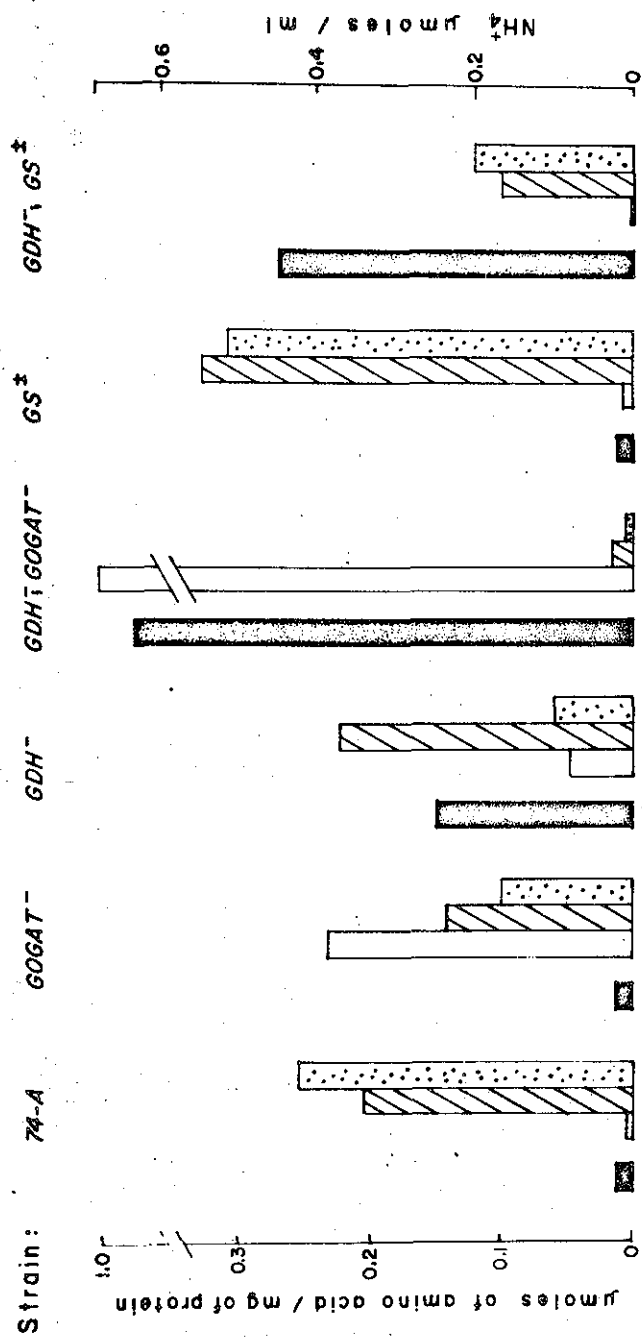


Fig. 1b

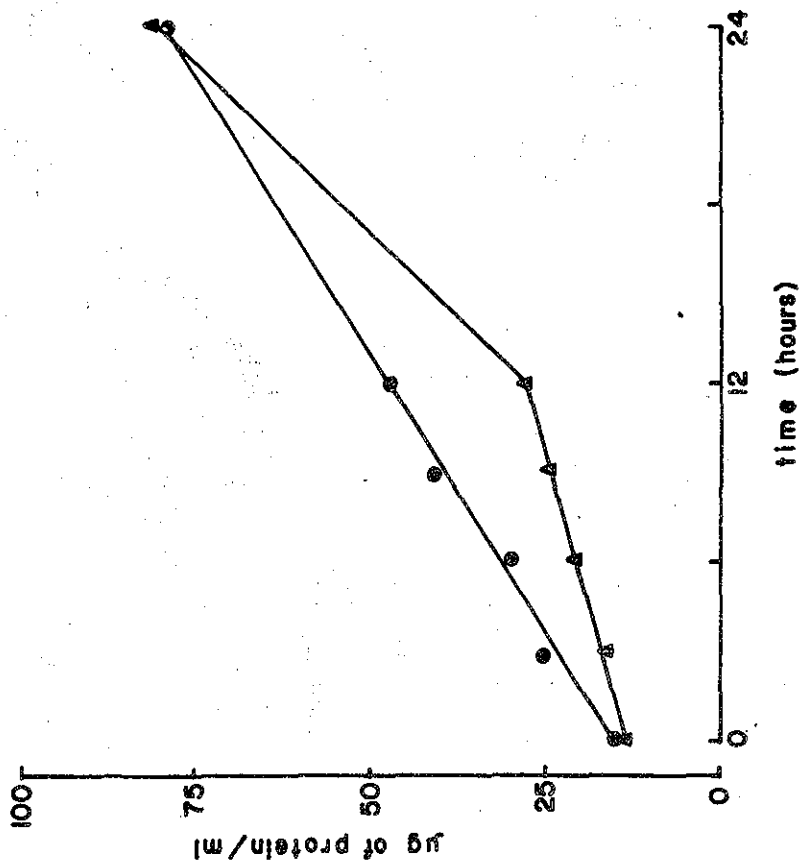


Fig. 2b

DISCUSION.

Se ha reportado que en Neurospora crassa es necesaria la resíntesis de la glutamina para la acumulación de arginina en células que no están creciendo (36), o durante el crecimiento de una mutante impedida en la regulación del nitrógeno - - (37). Se ha propuesto que la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa participan en la degradación de la glutamina (36). Hace algún tiempo Monder y Meister reportaron la presencia de una transaminasa específica de glutamina en Neurospora crassa. Sin embargo, ellos no encontraron condiciones en que la actividad de ω -amidasa fuera capaz de hidrolizar el α -cetoglutaramato sintetizado por la transaminasa de glutamina (38).

En este trabajo se ha demostrado la presencia de una actividad de transaminasa entre glutamina y fenilpiruvato que da lugar a la formación de fenilalanina y α -cetoglutaramato. Para que se acumule óptimamente el α -cetoglutaramato proveniente de la reacción de la transaminasa de glutamina es necesaria la presencia de 6-díazo-5-oxo-L-norleucina (DON) que es un - inhibidor de transamidasa y glutaminasa que también inhibe la actividad de la ω -amidasa (tabla 1a).

También se detectó la actividad de la ω -amidasa que hidroliza α -cetoglutaramato a α -cetoglutarato y amonio (tabla 2a). Debido a que el DON y el α -cetosuccinamato son inhibidores de la actividad de ω -amidasa, estos previenen la - -

degradación del α -cetoglutarato formado durante la reacción de transaminación de glutamina (tabla 1a). La actividad específica de la ω -amidasa de Neurospora crassa es tres veces mayor que la de la transaminasa de glutamina, y es la mitad de la actividad mayor de ω -amidasa reportada en células de animales (27), la cual es también inhibida por DON.

La transaminasa de glutamina y la ω -amidasa tienen un papel en la degradación de la glutamina como lo sugiere: a). La actividad in vitro de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa (tabla 1a y 2a), b). La acumulación de α -cetoglutarato in vivo en presencia de DON y no en presencia de amino-oxiacético (AOA) y DON, c). La excreción de amonio a partir de glutamina en una cepa GDH^- , y d). La inhibición por AOA o DON de la excreción de amonio de la cepa $GOGAT^-$; GDH^- en presencia de glutamina (Fig. 1a).

No se encontró la actividad de glutaminasa en Neurospora crassa aunque se intentaron muy diversas condiciones de crecimiento y diversos ensayos (42).

En cuanto a la participación de L-aminoácido oxidasa en la degradación de la glutamina, se ha reportado que la glutamina reprime a esta enzima (33). Se encontró que la actividad de L-aminoácido oxidasa en glutamina como fuente de nitrógeno es muy baja comparada con la actividad que se encuentra en histidina. Debido a que el DON inhibe completamente la - -

excreción de amonio a partir de glutamina (Fig. 1a) y a que la L-aminoácido oxidasa no es inhibida in vitro por este compuesto parece ser que esta enzima tiene un papel menor en la degradación de glutamina.

La GOGAT juega un papel importante en la asimilación de la glutamina como lo indica la acumulación de la glutamina y la disminución en el contenido de glutamato y alanina en una mutante que carece de la actividad de esta enzima (Fig. 1b). Estos efectos son más aparentes en la doble mutante GOGAT⁻; GDH⁻ que acumula una gran cantidad de glutamina y tiene una poza de glutamato y alanina muy pequeña. La mayor excreción de amonio de la cepa GOGAT⁻; GDH⁻ comparada con la cepa GDH⁻ puede explicarse por la limitación de glutamato que impide la asimilación de éste por la GS. El alto contenido de glutamina en la cepa GOGAT⁻; GDH⁻ posiblemente se debe a que la limitación de glutamato impide la distribución de la glutamina ya que ambos aminoácidos se requieren en algunas vías biosintéticas. El bajo crecimiento que presenta una cepa GOGAT⁻; GDH⁻ en glutamina como fuente de nitrógeno, así como su crecimiento óptimo en aminoácidos que eficientemente dan glutamato por transamidación, indican que la contribución de otras transamidadas a la poza de glutámico debe ser pequeña. Los resultados obtenidos indican que las enzimas que participan en la síntesis de glutamato en glutamina como fuente de nitrógeno son principalmente la GOGAT y la GDH. Esta última enzima asimila el nitrógeno que proviene de la degradación de -

la glutamina por la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa.

El amonio liberado a partir de la glutamina no sólo es asimilado por la GDH sino también por la GS como lo indica: - a). La mayor excreción de amonio de la cepa $GDH^-; GS^+$ en comparación con la cepa GDH^- (Fig. 1b), b). La acumulación de glutamato y alanina que se da en la mutante GS^+ (Fig. 1b), c). - El marcaje de la glutamina en la cepa silvestre en presencia de $[^{14}C]$ sacarosa y la disminución del marcaje en glutamina en una cepa GS^+ (tabla 2b). La excreción de hasta un 50% del nitrógeno de la glutamina como amonio en la cepa $GOGAT^-; GDH^-$ (tabla 1b) indica que una gran parte de la glutamina es degradada a amonio y que éste es asimilado nuevamente en glutámico y glutamina por la GDH y GS.

En este trabajo se ha demostrado que para asimilar - - glutamina como fuente de nitrógeno es necesario convertir este aminoácido a glutámico, y que la GOGAT y la vía de la transaminasa de glutamina junto con la GDH son las enzimas que participan en esa conversión.

La síntesis de glutamina en presencia de este aminoácido como fuente de nitrógeno es necesaria como lo indica la correlación encontrada entre el crecimiento y la actividad de la GS en la cepa GS^+ en limitación de glutamina. La cepa GS^+ tiene el polipéptido β de la glutamina sintetasa alterado, el cual forma un híbrido anormal con el polipéptido α que no tiene acti

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

vidad (39) y por lo tanto la síntesis de la glutamina se ve disminuida. Esto explica el pobre crecimiento de la cepa GS^+ durante las primeras 12 horas de crecimiento. La elevación de la actividad de la glutamino sintetasa que se encuentra a las 24 horas de crecimiento se explica debido a que en limitación de nitrógeno se expresa preferencialmente el polipéptido α (12). Por lo tanto en esta condición el polipéptido β alterado no alcanza inactivar todo el polipéptido α sintetizado. Debido a esto la mutante GS^+ ya puede sintetizar glutamina y puede crecer mejor después de 12 horas de crecimiento.

La glutamina también se degrada por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa en amonio como fuente de nitrógeno como lo sugiere: a). La presencia de la actividad de la transaminasa de glutamina y de la ω -amidasa, b). La acumulación de α -cetoglutaramato en presencia de DON y c). El hecho de que en una mutante sin actividad de asparagino sintetasa pueda sustituirse su requerimiento por asparagina, con su correspondiente α -cetoácido (α -cetosuccinamato), debido a la aminación de éste por la transaminasa de glutamina. Estos datos indican que el reciclaje de glutamina también opera en esta condición. En un estudio con ^{13}N sobre la asimilación de amonio en B. megaterium y en E. coli, encontraron que hay un gran recambio del nitrógeno celular (40).

El reciclaje de glutamina en Neurospora crassa puede servir para varias funciones aparte de la de contribuir a la irreversibilidad de la transaminasa de glutamina debido a la

síntesis endergónica de glutamina, que en la reacción total envuelve un gran cambio de energía libre que favorece la formación de aminoácidos por esta transaminasa (27). Debido a que la glutamina, aparte de ser un donador de nitrógeno es también un correpresor de catabolismo nitrogenado (17), su recambio puede ser una manera de regular rápidamente su concentración intracelular (41). Esto es debido a que un aumento en la velocidad de síntesis de la glutamina, combinado con una disminución en la velocidad de degradación de ésta, ocasionaría una rápida acumulación de la glutamina y viceversa una disminución en la velocidad de síntesis de la glutamina acompañada de un aumento en la degradación de ésta, ocasionaría una rápida disminución en la glutamina intracelular. De esta manera se regularía rápidamente la concentración de la glutamina en la célula y ésta a su vez regularía las actividades de la síntesis y la degradación del nitrógeno celular. El reciclaje de la glutamina puede ser también un mecanismo general para tomar o liberar el carbono de los compuestos orgánicos nitrogenados. Por último, el reciclaje de la glutamina a glutamato y otros aminoácidos puede ser una manera de mantener el balance de los compuestos nitrogenados (27).

CONCLUSION.

En este trabajo se demuestra que Neurospora crassa, en glutamina como fuente de nitrógeno, degrada a este aminoácido - por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa para dar un aminoácido, α -cetoglutarato y amonio. El amonio que proviene de la degradación de la glutamina es asimilado por la - - deshidrogenasa glutámica para dar glutamato y por la glutamino sintetasa para dar glutamina. Esto da lugar a un ciclo en el - - cual la glutamina es degradada y resintetizada. La resíntesis - de la glutamina es necesaria aún en glutamina como fuente de ni trógeno.

Se demuestra también que la glutamato sintasa participa en la asimilación de la glutamina para dar 2 moléculas de - glutamato y que esta vía junto con la deshidrogenasa glutámica son las más importantes para sintetizar glutamato.

REFERENCIAS.

1. Blumenthal, K.M., and E.L. Smith. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 6002-6008.
2. Holder, A.A., J.C. Wotton, A.J. Baron, C.K. Chambers, and J. K.S. Fincham. 1975. *Biochem. J.* 149: 757-773.
3. Brett, M., G.K. Chambers, A.A. Holder, J.R.S. Fincham, and J.C. Wotton. 1976. *J. Mol. Biol.* 106: 1-22.
4. Fincham, J.R.S., and A. J. Baron. 1977. *J. Mol. Biol.* 110: 627-642.
5. Seale, T.W., M. Brett, A.J. Baron, and J.R.S. Fincham. 1977. *Genetics.* 86: 261-274.
6. Sidding, M.A.M., J.A. Kinsey, J.R.S. Fincham, and M. Keighren. 1980. *J.Mol. Biol.* 137: 125-135.
7. Hernández, G., R. Sánchez-Pescador, R. Palacios, and J. Mora. 1983. *J. Bacteriol.* 154: 524-528.
8. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 127-133.
9. Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 134-140.
10. Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, and J. Mora. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 106: 251-259.

11. Quinto, C., J. Mora, and R. Palacios, 1977. J. Biol. Chem. 252: 8724-8727.
12. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, and J. Mora. 1982. J. Bacteriol. 150: 105-112.
13. Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hansberg, J. Mora, and R. Palacios. 1978. J. Bacteriol. 136: 880-885.
14. Mora, Y., O. Chávez and J. Mora. 1980. J. Gen. Microbiol. 118: 455-463.
15. Stadman, E.R., and Geinburg, A. 1974. The enzymes, Vol X, 3rd edition pp. 755-807, Academic Press.
16. Vaca, G. and Mora, J. 1977. J. Bacteriol. 131: 755-767.
17. Marlu, G.A. 1981. Microbiol. Rev. 45: 437-461.
18. Tate, S.S. and Meister A. 1973. The enzymes of Glutamine Metabolism. Academic Press Inc New York, Prusiner S. and Stadman E.R. Ed. pp. 77-127.
19. Powers, S.G., and Meister. A. 1978. J. Biol. Chem. 253: 800-807.
20. Meister, A. and S.G. Power. 1978. Adv. Enz. Reg. 16: 287-298.
21. Meister, A. 1980. Glutamine Metabolism, Enzymology, and Regulation, J. Mora and R. Palacios Ed. Academic Press Inc. pp. 1-40.
22. Freese, E., S.W., Park and M. Casbel, 1964. Proc. Nat. Acad. Sc. 51: 1164-1168.

23. Tempest, D.W., y J.L. Meers and C.M. Brown. 1970. *Biochem. J.* 117: 407-411.
24. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1688-1694.
25. Imada, A., K. Igarasi, K. Nakahama, and M. Isono. 1973. *J. Gen. Microbiol* 76: 85-99.
26. Prusiner, S., and Stadman E.R. 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1474-1481.
27. Cooper, A.J.L., and A. Meister. 1977. *Crit. Rev. in Biochem.* 4: 251-267.
28. Cooper, A.J.L. and A. Meister. 1981. *Comp. Biochem. Physiol.* 698: 137-142.
29. Kretovich, W.L. 1958. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 20, 319-323.
30. Cambell, L.L. 1956. *J. Bacteriol.* 71: 81-87.
31. Kilby, B.A. and E. Neville. 1956. *Biochim. Biophys. Acta.* 19: 383-388.
32. Thayer, P. S. and N.H. Horowitz. 1951. *J. Biol. Chem.* 192: 755-767.
33. Sikora L, and G.A. Marzluf. 1984. *Mol. Gen. Genet.* 183: 33-39.
34. Mora, Y., G. Espin, K. Willms, and J. Mora. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 104: 241-250.

35. Espín, G., and J. Mora, 1978. *J. Gen. Microbiol.* 104: 233-240.
36. Espín, G., R. Palacios, and J. Mora, 1979. *J. Gen. Microbiol.* 115: 59-68.
37. González A., M. Tenorio, G. Yaca and J. Mora, 1983. *J. Bacteriol.* 155: 1-7.
38. Monder, C., and A. Meister, 1958. *Biochim. Biophys. Acta.* 28: 202-203.
39. Dávila G. G., S. Brom, Y. Mora, R. Palacios and J. Mora, 1983. *J. Bacteriol.* 156: 993-1000.
40. Choong-Hyung, Kim and T.H. Hollocher, 1982. *J. Bacteriol.* 151: 358-366.
41. Kate, J. and R. Rognstand, 1976. *Current Topics in Cell Regulation.* 10: 237-289.
42. Cárdenas, M.E. and W. Hansberg, 1984. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1733-1741.