

03081 8
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL C.C.H.

EL PAPEL DE LA GLUTAMINASA EN
Rhizobium etli

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA LA M. EN IBB.
SOCORRO C. DURAN VARGAS

MEXICO, D. F. 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
U. N. A. M.

Bajo la dirección del Dr. Jorge F. Calderón Jiménez

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO FUI APOYADA
ECONOMICAMENTE POR LA DIRECCION GENERAL DE
ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO

Y POR EL PROGRAMA DE APOYO A LAS DIVISIONES DE
ESTUDIOS DE POSGRADO- TESIS DOCTORAL
A TRAVES DE LA COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Huitrón, al Dr. David Romero y al Dr. Jorge Calderón
por su participación en mi comité tutorial

A la Dra. Susana Brom, al Dr. Jorge Calderón, a la Dra. Laura Camarena
a la Dra. Carmen Gómez, al Dr. Mario Rocha, al Dr. David Romero y al Dr. Luis Servín
por las observaciones realizadas al trabajo

Al Q. Luis Sánchez y al Biól. Alejandro Huerta
por las aportaciones realizadas al trabajo

A la Q.F.B. Gisela Du Pont y al M. en C. Leobardo Olea
por revisar el contenido del trabajo

AL MEJOR DE LOS MAESTROS DURANTE MI FORMACION ACADEMICA

AL DR. JORGE CALDERON JIMENEZ

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	15
RESULTADOS.....	16
RESULTADOS ADICIONALES.....	47
DISCUSION.....	62
CONCLUSION.....	72
PERSPECTIVAS.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	75

RESUMEN

La glutamina es un compuesto clave en el metabolismo del nitrógeno en microorganismos (1,2,3). Debido a que la concentración intracelular de la glutamina es el resultado de su síntesis y su degradación y a que en *Neurospora crassa* se ha encontrado que la degradación de la glutamina juega un papel importante en el metabolismo de carbono y nitrógeno (4,5,6), decidimos estudiar la degradación de la glutamina en *Rhizobium etli*. Este es un microorganismo de gran interés biotecnológico para nuestro país, debido a que fija nitrógeno atmosférico en simbiosis con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol).

En *R. etli* la glutamina es degradada por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa y por la glutaminasa. Hemos propuesto que el papel de la transaminasa de glutamina es el de sintetizar de manera irreversible glicina o alanina y así mantener el balance de aminoácidos. Y que la glutaminasa juega un papel importante en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono cuando se utiliza este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno, esta enzima también participa en mantener el balance óptimo de las pozas de la glutamina y el glutamato (69).

En este trabajo se aisló y caracterizó una cepa de *R. etli* (LM16), alterada en la actividad de la glutaminasa. La cepa LM16 fue seleccionada por su incapacidad de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, fue capaz de crecer en otras fuentes de nitrógeno y carbono.

En comparación con la cepa silvestre, la cepa LM16 tiene pozas altas de glutamina, bajas de glutamato, excreta menos amonio y menos $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[U- ^{14}C]glutamina cuando crece utilizando glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. Lo anterior indica que el papel principal de la glutaminasa en *R. etli* es utilizar a la glutamina como fuente de carbono. El hecho de que la cepa LM16 tenga pozas altas de glutamina y bajas de glutamato en diversas condiciones de crecimiento, indican que la glutaminasa también participa en mantener el balance óptimo entre la glutamina y el glutamato.

La cepa LM16 nodula y presenta una actividad de nitrogenasa similar a la de la cepa silvestre; sin embargo, los bacteroides de esta cepa tienen una poza alta de glutamina y baja de glutamato. Esto sugiere que la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono por la glutaminasa podría tener un papel importante durante la simbiosis entre *R. etli* y *Phaseolus vulgaris* (70).

Se clonó en un plásmido (pCD24) una región del genoma de *R. etli* que complementa la mutación de la cepa LM16; este plásmido se introdujo en las cepas silvestres de *R. etli* (CE3/pCD24) y de *R. meliloti* (Rm/pCD24). Estas transconjugantes presentan una mayor actividad de glutaminasa, comparada con las cepas silvestres.

Para conocer el efecto de la disminución y de la sobreexpresión de la actividad de glutaminasa sobre las enzimas que participan en la síntesis y en la degradación de la glutamina, se determinaron las actividades de las glutamino sintetetasas (GSs) I y II y de la

glutamato sintasa (GOGAT) en la cepa LM16 y en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24.

En la cepa LM16 los niveles de actividad de las GSs I y II son similares a los de la cepa silvestre. Esto podría explicarse asumiendo que la baja actividad de la glutaminasa en la cepa LM16 está compensada por otras enzimas que participan en la degradación de la glutamina. La actividad de la GOGAT en la cepa LM16 se encuentra ligeramente elevada solo en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno. En las cepas con el plásmido pCD24 los niveles de actividad de las GSs I y II y de la GOGAT son similares a los de la cepa silvestre. Esto sugiere que la glutaminasa o las GSs podrían regularse alostéricamente.

Estudios recientes en nuestro laboratorio muestran que en *R. etli* existen dos isoenzimas de la glutaminasa que se distinguen por su termoestabilidad y por su movilidad electroforética. Una de estas glutaminasas es termolábil mientras que la otra es termoestable a 50 °C. La cepa LM16 carece de la actividad termolábil y solo presenta actividad termoestable. Al analizar en geles nativos de poliacrilamida, en los extractos de la cepa silvestre de *R. etli* se identificaron dos bandas de actividad y los extractos de la cepa LM16 solo se identificó una banda. En las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 se identificó una banda que corresponde a la glutaminasa termolábil.

El hecho de que una de las bandas de la transconjugante Rm/pCD24 posea una migración similar a una de las bandas de *R. etli*, sugiere fuertemente que el plásmido pCD24 lleva el gene estructural que codifica para la glutaminasa de *R. etli*.

INTRODUCCION

La glutamina tiene un papel central en el metabolismo nitrogenado en microorganismos, es considerada uno de los donadores universales de nitrógeno. El nitrógeno amido y amino de la glutamina pueden ser utilizados en la síntesis de aminoácidos, mientras que el nitrógeno amido puede ser usado también en la síntesis de nucleótidos, aminoazúcares y cofactores (1). En algunos microorganismos se ha propuesto a la glutamina como el correpresor del catabolismo nitrogenado. Así, de su concentración celular depende la regulación de la expresión genética de un gran número de enzimas del metabolismo nitrogenado (2,3). Su concentración determina también la utilización del nitrógeno del medio y la velocidad de síntesis y degradación de compuestos nitrogenados celulares. En *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* se ha sugerido que la síntesis y la degradación de la glutamina pueden ser puntos importantes de control para coordinar el metabolismo de nitrógeno y de carbono (4,5,6,7,8).

LA SINTESIS DE LA GLUTAMINA.

LA GLUTAMINO SINTETASA:

La síntesis de la glutamina es llevada a cabo por la glutamino sintetasa (GS) a partir de amonio y glutamato. En *Escherichia coli*, la GS está sujeta a regulación alostérica por

varios productos finales del metabolismo de la glutamina, se regula transcripcionalmente por NtrB y NtrC y postranscripcionalmente por adenilación (9,10,11,12).

En las bacterias de la familia *Rhizobiaceas*, que incluye los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium*, se encuentran al menos dos isoformas de la GS (GS I y GS II) con la excepción de *Azorhizobium caulinodans* que solo tiene una GS (13,14,15,16).

La GS I está codificada por el gene *glnA* y es estructural y enzimáticamente parecida de la GS de procariotes. Esta es una enzima polimérica de 12 subunidades idénticas de 52 kDa cada una, se regula postranscripcionalmente por adenilación reversible, es termoestable a 50 °C y se sintetiza constitutivamente (17,18). Los genes *glnA* de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Bradyrhizobium japonicum* y *R. etli* han sido clonados (19,20,21,22). Se ha secuenciado el gene *glnA* de *Rhizobium leguminosarum*, la proteína codificada por este gene presenta una secuencia de aminoácidos con alta homología a la de *E. coli*, *Azospirillum brasilense* y *Anabaena variabilis* (18,23,24).

En contraste, la GS II es diferente a la GS de procariotes y no está sujeta a regulación postranscripcional. La GS II, es una enzima que se regula por la fuente de nitrógeno en el medio y no se expresa en mutantes en *ntrA* o *ntrC* (17,18,25,26). La GS II tiene 8 subunidades de 36 kDa cada una, es termolábil y está codificada por el gene *glnII*. Este gene ha sido clonado y secuenciado en *R. meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* y *R. leguminosarum* (25,27,28,29). Las proteínas codificadas por estos genes, presentan una secuencia de

aminoácidos con una similitud del 80% entre ellas y un 40% de similitud con varias secuencias de aminoácidos de GS de plantas y animales (25, 27,29).

En *R. meliloti* y en *R. etli*, se ha identificado un tercer gene, *ghlT*, que codifica para la GSIII (26,30,31). Este gene no tiene similitud a nivel de DNA con *ghlA*, ni con *ghlII*. Se ha encontrado que el gene *ghlT* codifica para una proteína que tiene un peso molecular de 48 kDa, presenta una alta afinidad por ATP, muy baja para glutamato y amonio (32).

LA ASIMILACION Y DEGRADACION DE LA GLUTAMINA.

En la asimilación y en la degradación de la glutamina participan varias enzimas: las transamidadas, la oxidasa de L-aminoácidos, la glutamato sintasa, la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa y la glutaminasa.

LA TRANSAMIDASA:

Las transamidadas 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 glutamato; la mayoría de estas enzimas utilizan ATP. Así, el grupo 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 purinas, los grupos aminos de la glucosamina, guanina, citosina, ácido p-aminobenzoico, el átomo de nitrógeno del carbamifosfato, el

átomo de nitrógeno 1 del anillo del imidazol de histidina y el átomo de nitrógeno del pirrol del triptofano (1).

La transamidasa más estudiada es la carbamil fosfato sintetasa de *E. coli*. Esta enzima tiene un peso molecular de 163 kDa y está compuesta por dos subunidades, una subunidad pesada de 130 kDa y una subunidad ligera de 40 kDa. 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 -glutamil 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 carbamil fosfato a partir de amonio, pero no a partir de glutamina. La subunidad ligera cataliza la hidrólisis de la glutamina. Los aspectos estructurales y funcionales descritos para la carbamil fosfato sintetasa respecto al sitio de unión a la subunidad ligera son características generales de las transamidasas. Así, parece que el grupo amido de la glutamina se une a un sitio que se encuentra cerca de otro que une amonio (33,34).

LAS OXIDASAS DE L-AMINOACIDOS:

Las oxidasas de L-aminoácidos catalizan la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos a su correspondiente 2-oxoácido y amonio. En los microorganismos se han encontrado diversas oxidasas de L-aminoácidos que son diferentes en su especificidad a L-

aminoácidos. Estas han sido clasificadas de acuerdo a su especificidad para degradar aminoácidos, así, existen oxidasas de L-aminoácidos que se caracterizan por su limitada especificidad por el sustrato, como la oxidasa de L-lisina de *Trichoderma viride*, la oxidasa de fenilalanina de *Pseudomonas*, la oxidasa de L-glutamato de *Streptomyces violascens* y *Streptomyces sp*, la oxidasa de L-cisteína de *Neisseria meningitidis* y la oxidasa de L-aminoácidos de *Anacystis nidulans*.

Otras oxidasas de L-aminoácidos se caracterizan por su amplia especificidad de sustrato, como la oxidasa de fenilalanina de *Proteus mirabilis*, la oxidasa de L-aminoácidos de *Amphiora crassissima*, *Corynebacterium*, *Neurospora* y *Proteus rettgeri*. En este grupo también se encuentra la oxidasa de veneno de víbora y la de riñón de rata (35,36).

Proteus rettgeri tiene dos oxidasas de L-aminoácidos, la oxidasa I que utiliza como mejores sustratos a los compuestos aromáticos, compuestos con grupo sulfuro, imino y β -hidroxi-L-aminoácidos. Esta enzima es termoestable y tiene un pH óptimo de 7.6. La oxidasa II que utiliza como mejores sustratos la L-arginina, L-histidina, L-ornitina, L-lisina y L-citrulina. Esta enzima tiene alta afinidad por arginina, es termoestable y tiene un pH óptimo de 7.9 (37).

LA GLUTAMATO SINTASA:

La glutamato sintasa (GOGAT) es una transamidasa que cataliza la transamidación reductiva de la glutamina con el 2-oxoglutarato para dar dos moléculas de glutamato. Esta enzima sólo se encuentra en microorganismos y plantas (38,39,40,41).

En *Klebsiella aerogenes* se encontró, mediante la caracterización de mutantes sin la actividad de la GOGAT que esta enzima es esencial para el crecimiento en medios con amonio a una concentración menor a 1 mM. La síntesis de la GOGAT es controlada por represión: un decremento en los niveles de amonio o de glutamina conducen a una rápida síntesis de esta enzima. Se ha sugerido que la función de la GOGAT en *K. aerogenes* es la de suplementar a la célula glutamato en condiciones de limitación de nitrógeno (42).

En *Salmonella typhimurium*, los genes estructurales de la GOGAT se encuentran en un operón que comprende los genes *gltB* que codifica para la subunidad grande de la glutamato sintasa y el gene *gltD* que codifica para la subunidad pequeña. La regulación de la GOGAT en *S. typhimurium* es compleja debido a que los niveles de la actividad disminuyen en diferentes condiciones de crecimiento: en glutamato como fuente de nitrógeno, en limitación de glutamina o de glutamato. Se sugiere que en *S. typhimurium* la función de la GOGAT es sintetizar glutamato en limitación de nitrógeno, al igual que en *K. aerogenes* (43).

En *E. coli* la GOGAT está compuesta de 4 dímeros, cada dímero consiste de 2 diferentes subunidades con peso molecular de 53 y 135 kDa. La actividad óptima de la

GOGAT es a pH de 7.0. Los niveles de actividad se encuentran altos en medios mínimos suplementados con amonio y son independientes de la concentración de amonio. La actividad de esta enzima es inhibida por algunos aminoácidos (12,44) y se reprime por glutamato. Los genes de la GOGAT de *E. coli* forman parte del operón *gltBDF* que comprende dos genes estructurales *gltB* y *gltD* y un tercer gene regulatorio *gltF* (45).

La GOGAT de *Bacillus subtilis* se regula por la fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento, posiblemente se regula por un gene-específico regulador que responde a la poza intracelular de amonio o de glutamato o de ambos. En *B. subtilis* se clonaron los genes *gltA* y *gltB*, que codifican para dos subunidades de la GOGAT, mediante la complementación de mutantes con un banco de *B. subtilis* (46).

La GOGAT de *R. meliloti* es una enzima esencial para asimilar amonio, se encuentra alta independientemente de la concentración de amonio (47). Mutantes afectadas en la actividad de la GOGAT son incapaces de asimilar amonio y requieren glutamato u otra fuente de nitrógeno combinada para crecer. Se ha clonado el locus *glt* que codifica para la GOGAT en *R. meliloti* (48) y en *Azorhizobium sesbaniae* (49), este locus es estructuralmente similar al locus *glt* de *E. coli* (44).

La actividad de la GOGAT en *R. etli* requiere como cofactor al NADPH, se reprime por glutamato y se inhibe por ácidos orgánicos. Esta actividad se encuentra alta cuando *R. etli* crece en amonio, nitrato o glutamina como fuente de nitrógeno. En cambio, cuando utiliza glutamato como fuente de nitrógeno, la actividad de esta enzima es baja. La

actividad de la GOGAT se encuentra cuatro veces más alta cuando *R. etli* utiliza succinato como fuente de carbono que cuando utiliza glucosa o fructosa. Estos datos se obtuvieron utilizando extractos sin dializar; en extractos dializados la actividad es similar en estas condiciones, por lo que se propone un efecto inhibitorio de metabolitos (17).

LA VIA DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMINA- ω -AMIDASA:

La transaminasa de glutamina cataliza la reacción de la transaminación entre la glutamina y diversos 2-oxoácidos. El 2-oxoglutarato producido por la transaminación de la glutamina es hidrolizado por una ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio. La reacción catalizada por la transaminasa de glutamina, a diferencia de otras transaminasas es irreversible *in vivo*, debido a que uno de los productos de la reacción, el 2-oxoglutarato, no se acumula porque es hidrolizado por la ω -amidasa (50,51).

La transaminasa de glutamina ha sido ampliamente estudiada en mamíferos. Se han reportado tres diferentes transaminasas de glutamina que difieren esencialmente en su especificidad por diferentes 2-oxoácidos y su localización intracelular. Una de ellas es la transaminasa de glutamina de hígado (L), cuyos mejores sustratos son la glutamina, la metionina, α -ceto- γ -metilbutirato, β -mercaptopiruvato y glioxalato. Otra es la transaminasa de glutamina de riñón (K), presente en el citosol, cuyos mejores sustratos son la glutamina, fenilalanina, y los correspondientes 2-oxoácidos. La tercera es la transaminasa de riñón, presente en la mitocondria, que difiere de la otra transaminasa de riñón en ciertas

propiedades físicas (52,53,54,55). La actividad de la ω -amidasa también ha sido encontrada en tejidos de mamíferos (55,56,57).

La vía de la transaminasa de la glutamina- ω -amidasa ha sido reportada en *N. crassa* como la vía que preferencialmente degrada la glutamina, debido a que en este hongo no se detectó la actividad de la glutaminasa (5,58,59).

En *S. cerevisiae* también ha sido estudiada la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa. En este microorganismo la actividad de la transaminasa de glutamina se incrementa en la presencia de glutamina y se disminuye en presencia de lisina o glicina; se sugiere que la glicina puede ser sintetizada por esta vía y que la glutamina modula positivamente su actividad (60,61).

LA GLUTAMINASA:

Las glutaminasas son enzimas que catalizan la desamidación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio. Se ha reportado que *E. coli* tiene dos isozimas 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 (62,63).

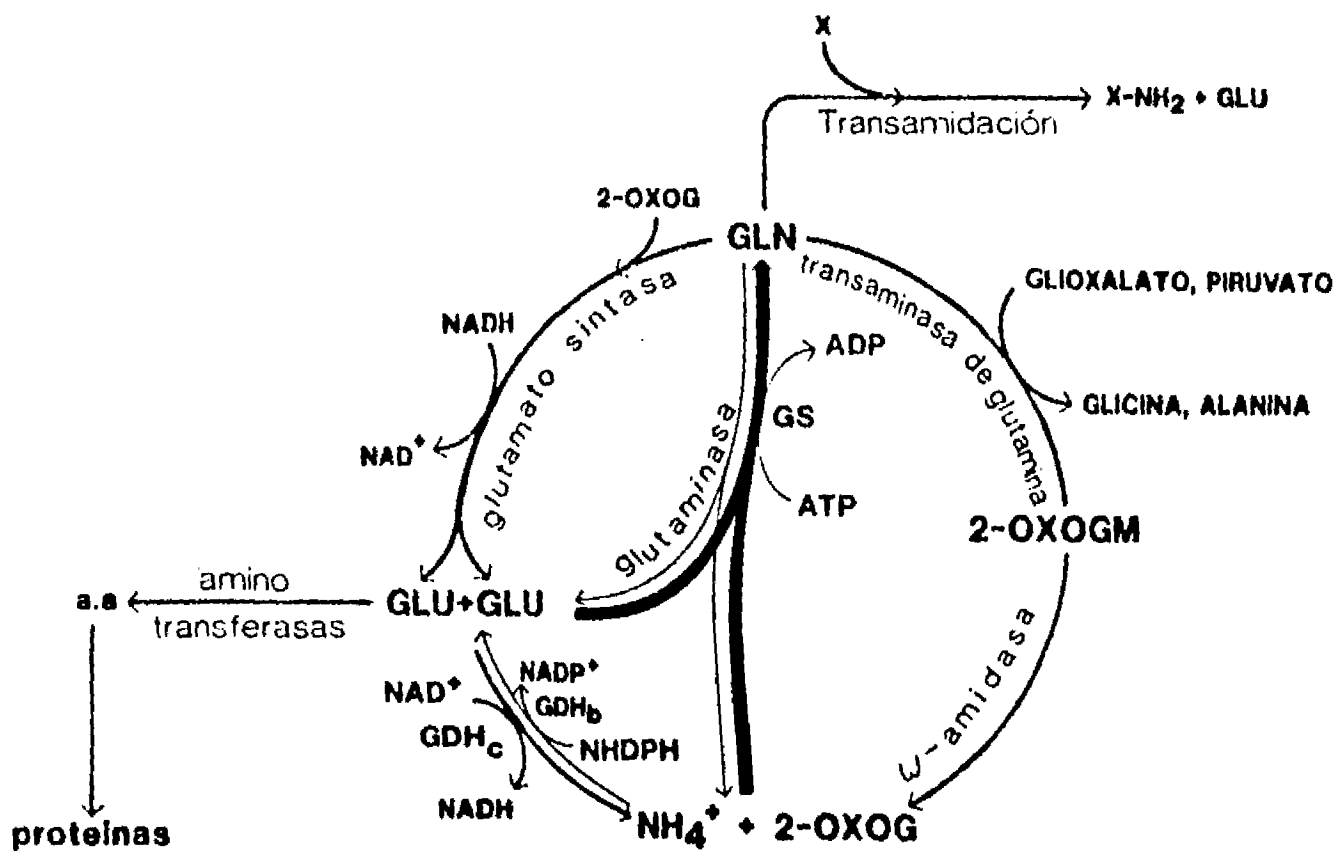
En *Saccharomyces cerevisiae* también se han reportado dos isozimas, una periplásmica, la glutaminasa A y una citoplásmica, la glutaminasa B. Estas isozimas se distinguen por su termoestabilidad, su sensibilidad a piruvato y 2-oxoglutarato y por su pH óptimo (64).

En *Bacillus licheniformis* se ha reportado la actividad de la glutaminasa y se sugiere la existencia de dos isozimas, una con un pH óptimo de 7.0 y otra con un pH óptimo de 9.0 (65). La glutaminasa también ha sido reportada en bacteroides de *Rhizobium lupini* (66,67).

En mamíferos se ha reportado la existencia de dos isoenzimas distintas. La glutaminasa de hígado, encontrada únicamente en hígado de rata adulta y la glutaminasa de riñón encontrada en riñón, cerebro, intestino y en hígado de feto de rata. El aislamiento y caracterización del cDNA de las glutaminasas muestra un 80% de homología entre las secuencias de aminoácidos de las dos isoenzimas. Estas isoenzimas difieren marcadamente en su tamaño, propiedades físicas, inmunoquímicas y en su regulación. El patrón de similitud entre las dos isozimas sugiere que probablemente son codificadas por genes separados (68).

Dado al papel central que tiene la glutamina en el metabolismo nitrogenado (1,2,3) y a que la glutamina puede tener un papel en coordinar el metabolismo de nitrógeno y el metabolismo de carbono (4,5,6,7,8), nosotros hemos estudiado la degradación de la glutamina en *R. etli*, un microorganismo de gran interés biotecnológico para nuestro país debido a que fija nitrógeno en simbiosis con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol).

En *R. etli* la glutamina es asimilada por la GOGAT y sintetizada por la GS (17). Nuestros estudios han demostrado que la glutamina es degradada por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa y por la glutaminasa (Fig. 1).



GLN: glutamina, **GLU:** glutamato **a.a:** aminoácido **GS:** glutamino sintetasa
NH₄⁺: amonio **GDH_b:** glutamato dehidrogenasa biosintética **2-oxog:** 2-oxoglutarato
GDH_c: glutamato dehidrogenasa catabólica **2-OXOGM:** 2-oxoglutaramato

Fig. 1. La asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*.

Para demostrar el papel de la glutaminasa en *R. etli*, se aisló y se caracterizó una mutante de *R. etli* que no puede crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y crece óptimamente en otras fuentes de carbono y de nitrógeno.

OBJETIVO GENERAL:

Conocer el papel fisiológico de la glutaminasa en *Rhizobium etli*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Aislar y caracterizar una cepa de *R. etli* que carezca de la actividad de la glutaminasa.
2. Clonar el gene que codifica para la glutaminasa en *Rhizobium etli*.
3. Caracterizar la cepa con el plásmido que tiene clonado el gene que codifica para la glutaminasa.

RESULTADOS.

Los resultados sobre la degradación de la glutamina en *R. etli*, se publicaron en *Microbiology* (1995), 141, 589-595. El título de este trabajo es: "Role of the glutamine transaminase- α -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*". Los autores son Socorro Durán and Jorge Calderón.

Los resultados sobre el papel de la glutaminasa en *R. etli* seran publicados en *Microbiology* (1995), 000-000. El título de este trabajo es: "The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant". Los autores son Socorro Durán , Gisela Du Pont, Alejandra Huerta-Zepeda and Jorge Calderón.

Role of the glutamine transaminase- α -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*

Socorro Durán and Jorge Calderón

Author for correspondence: Jorge Calderón. Tel. +52 6 22 38 50. Fax: +52 5 50 00 48.

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF 04510 and Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca Mor., Mexico

Evidence for the participation of the glutamine transaminase- α -amidase pathway and a glutaminase in the utilization of glutamine in *Rhizobium etli* has been obtained. The glutamine transaminase preferentially transaminates glyoxylate and pyruvate. Glutamine transaminase activity was similar under all growth conditions tested except on PY (rich medium) where it was low. Glutaminase activity was positively regulated by glutamine and negatively regulated by ammonium and by the carbon source. In *R. etli* bacteroids, glutamine transaminase was low, whereas glutaminase activity was high. Ammonium liberated from glutamine was assimilated by glutamine synthase, thus leading to the operation of a glutamine cycle that consumes ATP. Our results suggest that glutamine transaminase plays a biosynthetic role in the irreversible synthesis of glycine and alanine, whereas glutaminase plays a catabolic role in the degradation of glutamine to carbon skeletons and to maintain the optimal balance between glutamine and glutamate. The high glutaminase activity found in bacteroids indicates that the degradation of glutamine by this enzyme may play an important role during symbiosis between *R. etli* and *Phaseolus vulgaris*.

Keywords: *Rhizobium etli*, glutamine transaminase, α -amidase, glutaminase, catabolism, symbiosis

INTRODUCTION

Glutamine is the final product of ammonium assimilation and is a nitrogen donor for biosynthetic reactions (Stadtman, 1973). It has been proposed as the nitrogen metabolite responsible for nitrogen catabolite repression in several micro-organisms (Halpern, 1988) and consequently glutamine has a central role in nitrogen metabolism.

Glutamine is synthesized by glutamine synthase (GS) from ammonium and glutamate. In Rhizobia, ammonium assimilation proceeds mainly through the GS-glutamate synthase pathway (Bravo & Mora, 1988). The family *Rhizobiaceae*, which includes genera such as *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* is distinct from other bacteria in that its members have at least two forms of GS (Darrow & Knotts, 1977; Fuchs & Keister, 1980; Kumar

& Rao, 1986; Tsupurun *et al.*, 1987) with the exception of *Azorhizobium caulinodans* (Donald & Ludwig, 1984). The form termed GS1 is structurally and enzymically typical of prokaryotic GSs, its activity is post-translationally regulated by reversible adenylation and it appears to be synthesized constitutively (Bravo & Mora, 1988; Rossi *et al.*, 1989). In contrast, GSII is distinct from all other known prokaryotic GSs and is not subject to adenylation; GSII levels are dependent on the nitrogen source present in the medium and it is not expressed in either *utrA* or *utrC* mutants (Bravo & Mora, 1988; de Bruijn *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1988; Rossbach *et al.*, 1987; Rossi *et al.*, 1989; Shatters *et al.*, 1989). A third locus, called *ghnT*, that encodes a GSIII has been identified in *R. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Chiurazzi *et al.*, 1992; de Bruijn *et al.*, 1989; Espín *et al.*, 1990; Shatters *et al.*, 1993).

Although glutamine synthesis has been studied in *Rhizobium*, glutamine degradation has been scarcely studied, despite the fact that the intracellular glutamine concentration is the result of its synthesis and degradation. Taking into account the importance of glutamine metab-

Abbreviations: AOA, (aminoxy)acetic acid; DON, 6-diazo-5-oxo-nor-leucine; GS, glutamine synthase; MS, L-methionine-DL-sulfoximine; PY, peptone yeast medium.

olism, we decided to study the degradation of glutamine in *Rhizobium etli*, a bacterium that establishes symbiosis with *Phaseolus vulgaris* (bean) (Segovia *et al.*, 1993).

Evidence for the operation of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway in mammalian cells has been amply documented by Cooper & Meister (1977). In this pathway, glutamine is transaminated to yield different amino acids and 2-oxoglutarate through the participation of a glutamine transaminase; subsequently, the 2-oxoglutarate is hydrolysed to 2-oxoglutarate and ammonium by the action of an ω -amidase. There are three separate forms of glutamine transaminase in rat tissues: (a) the soluble L-form (liver) whose major substrates include glutamine, methionine, α -keto- γ -methiolbutyrate, 2-oxoglutarate, β -mercapto-pyruvate and glyoxylate; (b) the soluble K-form (kidney) whose major substrates include glutamine, phenylalanine, methionine and the corresponding 2-oxo-acids; and (c) the mitochondrial K-form which differs from the soluble form with respect to certain physical properties (Cooper & Meister, 1981). The presence of glutamine transaminase- ω -amidase has been reported in *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* (Calderón *et al.*, 1985; Soberón & González, 1987; Osorio *et al.*, 1993). In *N. crassa* the glutamine transaminase- ω -amidase pathway has been found to participate in a glutamine cycle in which this amino acid is continually degraded and resynthesized (Calderón *et al.*, 1989; Calderón & Mora, 1985, 1989).

Glutaminases catalyse the hydrolytic deamidation of L-glutamine resulting in the production of L-glutamate and ammonium. Two glutaminases have been detected in mammalian tissues: L-type glutaminase, which is found only in adult liver and is characterized by a relatively high K_m for glutamine, a low K_m for phosphate, activation by ammonia and lack of inhibition by glutamate; and K-type glutaminase, found in all other glutaminase-containing tissues, with a relatively low K_m for glutamine, a high K_m for phosphate and which is inhibited by glutamate. The glutaminases are the major enzymes responsible for glutamine breakdown in mammalian tissues (Smith & Watford, 1990). Glutaminases have been detected in several bacterial genera (Hartman, 1971) and in bacteroids of *Rhizobium lupini* (Kretovich *et al.*, 1981) but the best characterized glutaminases are those from *E. coli*, where two forms exist, glutaminase A and B (Prusiner, 1973). Glutaminase A has a pH optimum of 5 and its activity is controlled by nitrogen metabolites and cyclic AMP. In contrast, glutaminase B is active above pH 7, its activity is microconstitutive and it is allosterically regulated by adenine nucleotides, divalent cations and carboxylic acids (Prusiner, 1973). In this report we present evidence of the operation of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway and glutaminase in the degradation of glutamine in *R. etli*. We have also determined the 2-oxo-acid specificity of glutamine transaminase, the glutamine transaminase and glutaminase regulation, and their enzymic activities in bacteroids. In addition we found that when *R. etli* grows on glutamine plus succinate, the ammonium liberated from glutamine is assimilated by GS.

METHODS

Strains. The *Rhizobium etli* CI N42 wild type strain, previously classified as *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, was used in this study (Segovia *et al.*, 1993).

Growth conditions. Batch cultures of *R. etli* were grown at 30 °C and shaken at 200 r.p.m. For growth on minimal medium (MM) (Beringer, 1974), cells previously grown overnight on a rich medium (PY) containing 0.5% peptone, 0.3% yeast extract and 0.07 M CaCl₂ were washed and used as inoculum. The initial optical density of the medium was adjusted to 0.05 at 540 nm. The nitrogen and carbon sources in MM were used at 10 mM, except for glycerol which was 2% (v/v). Growth was monitored by measurement of the optical density at 540 nm and by protein determination using the Lowry method.

Determination of glutamine transaminase activity. Cell extracts were prepared by sonicating whole cells in extraction buffer (50 mM pyrophosphate, pH 8.5) with a Somprep 150 ultrasonic disintegrator; the homogenates were centrifuged for 2 min at room temperature in a microcentrifuge and dialysed for 2 h against extraction buffer at 4 °C. The activity was measured in a 0.5 ml reaction mixture containing 150 mM sodium borate (pH 8.5), 20 mM glutamine, 20 mM glyoxylate, 0.6 mM 6-diazo-5-oxo-norleucine (DON), 0.2 mM pyridoxal 5-phosphate, and 0.1 ml cell extract. When glutamine transaminase activity was assayed with 2-oxo-acids different from glyoxylate, these were used at a concentration of 20 mM except for β -phenylpyruvate and imidazolepyruvate (both at 10 mM) and 3-indolepyruvate (at 5 mM). The formation of 2-oxoglutarate was determined colorimetrically as described by Calderón *et al.* (1985). The formation of glycine was determined with an Amisco Amino Acid Analyser and an Amisco Ratio Fluorimeter after coupling with *o*-phthalaldehyde (Calderón *et al.*, 1985).

Determination of ω -amidase activity. Cell extracts were prepared in extraction buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM 2-mercaptoethanol) as described above. The activity was measured in a 1 ml reaction mixture containing 50 mM Tris/HCl, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.5, 10 mM 2-oxoglutarate and 0.2 ml cell extract. The formation of 2-oxoglutarate and ammonium were determined as described by White (1970).

Determination of glutaminase activity. Cell extracts were prepared in extraction buffer (100 mM KH₂PO₄, pH 8, for the colorimetric determination of ammonium, or 200 mM Tris/HCl, pH 8, for the determination of glutamine and glutamate) as described above. Ammonium formation was assayed in a 0.25 ml reaction mixture containing 30 mM KH₂PO₄, pH 8, 5 mM glutamine and 0.05 ml cell extract. Ammonium formation was measured as described by Chaney & Marbach (1962) and White (1970). The utilization of glutamine and the formation of glutamate was assayed in a 1 ml reaction mixture containing 40 mM Tris/HCl, pH 8, 5 mM glutamine and 0.2 ml cell extract. Glutamine and glutamate were determined with an Amisco Amino Acid Analyser and an Amisco Ratio Fluorimeter after coupling with *o*-phthalaldehyde (Calderón *et al.*, 1985).

Determination of GS activity. GS activity was assayed with cell extracts prepared by sonicating the cells in 10 mM imidazole hydrochloride and 0.5 mM EDTA (pH 7.0). GS was measured by its synthase activity as described by Bender *et al.* (1977). GS I and II were distinguished by their different heat stabilities for 1 h at 50 °C as described by Darrow & Knotts (1977).

Determination of glutamate synthase activity. Cell extracts were prepared in extraction buffer (100 mM KCl and 0.5% 2-mercaptoethanol, pH 7.6) as described above. The activity was

measured in a 1 ml reaction mixture containing 50 mM HEPES, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, pH 8.5, 3.65 mM glutamine, 3 mM 2-oxoglutarate, 0.2 mM NADPH, and 0.1 ml cell extract. NADPH oxidation was determined spectrophotometrically at 340 nm at 30 °C. (Bravo & Mora, 1988).

Ammonium determination. Ammonium concentration in medium samples was measured with an Orion electrode (Calderón & Mora, 1989).

Bacteroid isolation. Bacteroids from root nodules of *Phaseolus vulgaris* were isolated utilizing self-generating Percoll gradients as described by Retbach *et al.* (1981). A crude extract was prepared by gently crushing 6 g nodules with a mortar and pestle in 15 ml grinding buffer (150 mM NaCl and 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6). The crude homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and the residue washed with additional grinding buffer. The filtered crude extract was centrifuged for 5 min at 3000 r.p.m. (JA-20 fixed angle rotor, Beckman Instruments) for 3 min at 4 °C, the supernatant was centrifuged again for 15 min at 15000 r.p.m. and the pellet was resuspended in 2 ml grinding buffer. A 50 ml polycarbonate centrifuge tube was filled with 24.5 ml Percoll concentrate, 3.5 ml 500 mM KH_2PO_4 plus 1.5 M NaCl, pH 7.6, and 7 ml H_2O giving a final concentration of 70% (v/v) Percoll. One millilitre of extract was layered on the top of the gradient. The tube was centrifuged for 50 min at 20000 r.p.m. The bacteroids were collected by suction with a Pasteur pipette. Percoll was removed by diluting the bacteroid fraction 1:10 with 150 mM NaCl and 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6, and centrifuged for 20 min at 15000 r.p.m. The pellet was resuspended in 2 ml extraction buffer.

RESULTS

Glutamine transaminase- ω -amidase pathway

The stoichiometry of glutamine transaminase activity is shown in Table 1. Transaminase was measured in the presence of DON, an inhibitor of ω -amidase activity,

Table 1. Stoichiometry of *R. etli* glutamine transaminase with glyoxylate

Assay condition	Specific activity	Concn (μmol)*	
		Glycine	2-Oxoglutaramate
Complete system	12.6†	1.0	1.2
Without glutamine	< 0.5†	< 0.04	< 0.04
Without glyoxylate	< 0.5†	< 0.04	< 0.04
Without extract	< 0.5†	< 0.04	< 0.04
With 10 mM AOA	3.6†	0.3	0.3
With MS without glutamine	3.1†	0.3	< 0.04
With MS	11.9†	1.1	0.6
With glutamate without glutamine	8.3†	0.8	< 0.04
With glutamate	19.6†	1.9	1.2

* The production of glycine and 2-oxoglutaramate was determined at 45 min and the assay mixture contained 2.15 mg of dialysed extract from cells grown on glutamine plus succinate for 14 h.

† Expressed as $\text{nmol 2-oxoglutaramate min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$.

‡ Expressed as $\text{nmol glycine min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$.

Table 2. *R. etli* glutamine transaminase activity with different 2-oxo-acids as substrate

Enzyme activity was assayed from extract obtained from *R. etli* cultures grown on glutamine plus succinate for 14 h.

2-Oxo-acid	Relative activity (%)
Glyoxylate	100
Pyruvate	80
2-Oxobutyrate	78
2-Oxovalerate	59
2-Oxosuccinamate	57
2-Oxoisocaproate	33
2-Oxoadipate	27
2-Oxoglutarate	17
β -Phenylpyruvate	14
Imidazolepyruvate	14
2-Oxoisovalerate	11
β -Hydroxypyruvate	5
δ -Hydroxyphenylpyruvate	4
DL-2-Iso- β -methyl- α -valerate	3
3-Indolepyruvate	< 2
Oxalacetate	< 2

which allows optimal accumulation of 2-oxoglutaramate (Calderón *et al.*, 1985). The amounts of 2-oxoglutaramate and glycine formed in the complete assay were similar, and in the absence of either substrate, glutamine or glyoxylate, neither 2-oxoglutaramate nor glycine were detected. The reaction was inhibited by (aminoxy)acetic acid (AOA), a specific inhibitor of transaminases, but DON did not have any effect on the activity. L-Methionine-D-sulfoximine (MS), a glutamine analogue and substrate of glutamine transaminases (Calderón *et al.*, 1990; Griffith & Meister, 1978), is also a substrate of the *R. etli* enzyme since the amount of 2-oxoglutaramate formed was reduced twofold, whereas the formation of glycine was similar when this compound was present in the reaction. In contrast, when glutamate was present in the reaction, the formation of glycine was the sum of that formed when these amino acids were used separately, whereas the formation of 2-oxoglutaramate did not change (Table 1). These data indicate that glutamine transaminase is not able to utilize glutamate as a substrate.

Glutamine transaminase was assayed with different 2-oxo-acids as substrates (Table 2); the highest activity was found with glyoxylate followed by pyruvate.

We also found conditions for the coupled activity of glutamine transaminase and ω -amidase, measuring the glyoxylate-dependent release of ammonium from glutamine. This activity corresponds to about 50% of the activity found for glutamine transaminase (data not shown).

The stoichiometry of ω -amidase activity is shown in Table

Table 3. Stoichiometry of *R. etli* α -amidase

Assay condition	Specific activity [nmol ammonium min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	Concn (μmol)*	
		Ammonium	2-Oxo-glutarate
Complete system	4.8	0.32	0.29
Without 2-oxo-glutarate	< 0.5	< 0.03	< 0.03
Without extract	< 0.5	< 0.03	< 0.03
With 50 mM DON	< 0.5	< 0.03	< 0.03
With 10 mM AOA	4.8	0.32	†

* The production of ammonium and 2-oxoglutarate were determined at 20 min and the assay mixture containing 3.36 mg of dialysed extract from cells grown on glutamine plus succinate for 14 h.

† AOA interfered with the determination of 2-oxoglutarate.

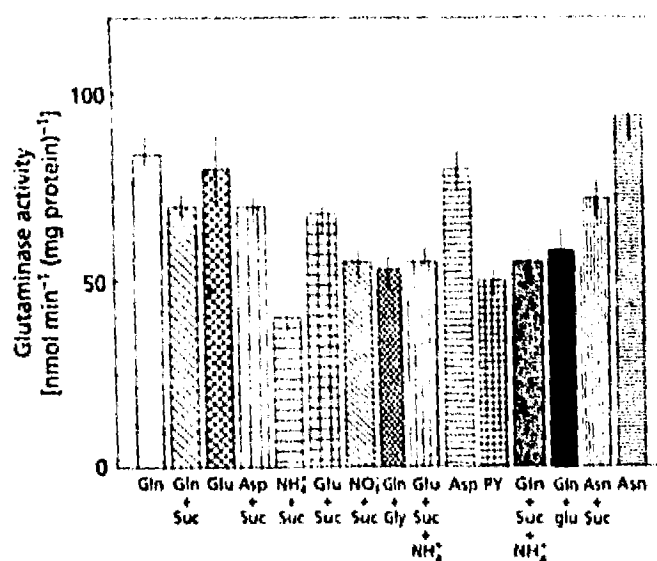


Fig. 1. *R. etli* glutaminase activity after 8 h of growth under different growth conditions. Asn, asparagine; Asp, aspartate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycerol; glu, glucose; Suc, succinate.

3. In the complete assay, the amounts of ammonium and 2-oxoglutarate formed were similar and in the absence of 2-oxoglutarate, neither ammonium nor 2-oxoglutarate were detected. The reaction was inhibited by DON but AOA did not have any effect on activity (Table 3).

Glutamine transaminase regulation was studied to analyse the participation of this enzyme in the degradation of glutamine and in the synthesis of some amino acids. We found that glutamine transaminase activity was similar during different growth stages (data not shown). Under the culture conditions tested (glutamine as nitrogen and

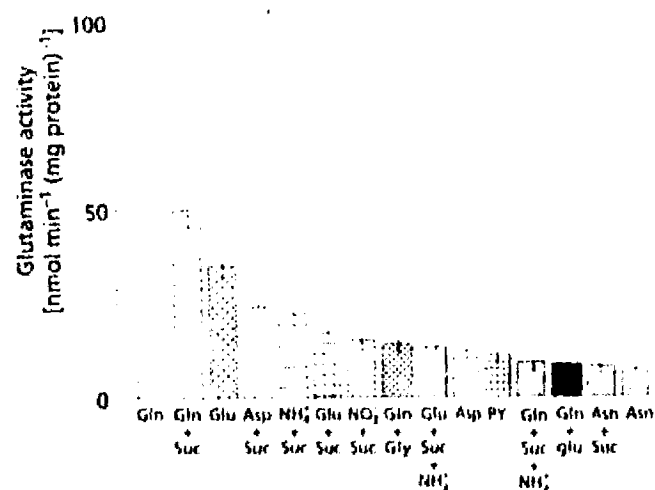


Fig. 2. *R. etli* glutaminase activity after 24 h of growth under different growth conditions. Abbreviations as for Fig. 1.

carbon source, glutamine plus succinate, ammonium plus succinate, ammonium plus glucose, ammonium plus succinate plus alanine, ammonium plus succinate plus aspartate and PY), transaminase activity was similar [approx. 13 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹] except in the rich medium (PY) where it was low [4.0 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹].

Glutaminase

In the stoichiometry of glutaminase activity in the complete assay, the amount of glutamine that disappeared (4.0 μmol) was similar to the amount of ammonium (4.6 μmol) and glutamate (5.0 μmol) formed, and the reaction was dependent on the substrate glutamine and the cell extract (data not shown).

Glutaminase activity was studied by examining the influence of nutritional conditions and of culture growth. This activity was markedly affected by the growth stage. Activity was high after 8 h of growth (Fig. 1), diminished after 12 h of growth, except on media containing glutamine, glutamine plus succinate or glutamate plus succinate (data not shown), and was low after 24 h of growth (Fig. 2). After 24 h of growth, glutaminase activity was high only under conditions where glutamine was nitrogen and carbon source and on glutamine plus succinate (Fig. 2).

When *R. etli* was grown on amino acids such as asparagine or aspartate or glutamate, with or without succinate, glutaminase activities were lower after 24 h of growth than when glutamine was present in the growth medium. Glutaminase activity was lower on glutamine plus another carbon source than when the latter was absent, and was higher on glutamine plus succinate than on glutamine plus glycerol or glutamine plus glucose. Glutaminase

activity on glutamine plus succinate or glutamate plus succinate was reduced by the presence of ammonium. Glutaminase activity was low when *R. etli* was grown on an inorganic nitrogen source such as ammonium or nitrate in a rich medium such as PY (Figs 1 and 2).

When *R. etli* was grown for 12 h on glutamine as nitrogen and carbon source, it excreted higher amounts of ammonium (0.7 mM) than when it was grown on glutamine plus succinate (0.06 mM). Since glutamine transaminase and glutaminase activities were similar under these conditions, we measured GS that could be participating in the assimilation of ammonium liberated from glutamine when *R. etli* was grown on glutamine plus succinate. GS I activity was twofold higher on glutamine plus succinate [$23 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$] than on glutamine as nitrogen and carbon source [$12 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$], and GS II activity on glutamine plus succinate was twofold higher [$44 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$] than GS I, whereas on glutamine as nitrogen and carbon source it was not detectable. We measured ammonium excretion on glutamine plus succinate plus MS, an inhibitor of GS (Ronzio & Meister, 1968), and found that *R. etli* excreted sixfold more ammonium than on glutamine plus succinate (0.37 mM). These results indicate that when *R. etli* grows on glutamine plus succinate, the ammonium liberated from glutamine is assimilated by GS, thus leading to the operation of a glutamine cycle.

Glutamine transaminase, ω -amidase and glutaminase activities of bacteroids from *R. etli*

To analyse the role of glutamine-degrading enzymes in bacteroids, *R. etli* bacteroids were isolated utilizing a self-generating Percoll gradient (Reibach *et al.*, 1981) and the glutamine-degradative enzyme activities were determined. Glutamine transaminase activity was low in bacteroids [$3.1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$] in comparison with the activity found in bacteria [$13 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]; ω -amidase had similar activity to that found when *R. etli* grows on glutamine plus succinate [$4.8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$], while glutaminase activity was the highest degradative enzyme activity found in bacteroids [$64 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]. This activity was as high as that found after 8 h of growth when *R. etli* grows on glutamine plus succinate [$68 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]. Glutamate synthase was also determined in bacteroids, since this enzyme uses glutamine and 2-oxoglutarate to synthesize 2 molecules of glutamate. Glutamate synthase activity in bacteroids was as low [$4.6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$] as glutamine transaminase and was 4.5-fold lower than that found when *R. etli* grows on ammonium plus succinate [$27 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$].

DISCUSSION

Glutamine transaminase

In this study we have demonstrated the presence of transaminase activity between glutamine and glyoxylate in *R. etli* that leads to the formation of glycine and 2-

oxoglutarate. Glutamine transaminase can use MS, a glutamine analogue and substrate of mammalian and *N. crassa* glutamine transaminases (Calderón *et al.*, 1990; Griffith & Meister, 1978). That this enzyme is different from glutamate transaminase is shown by the fact that specific transaminase activity assayed in the presence of glutamate and glutamine corresponds to the sum of the activities assayed separately (Table 1). Under glutamine transaminase assay conditions, ω -amidase is not active since the amount of 2-oxoglutarate formed was similar in the absence or presence of DON and was also similar to the formation of glycine. Nevertheless, we found conditions under which the coupled activity of glutamine transaminase and ω -amidase (data not shown), and the activity of ω -amidase (Table 3) could be measured. Glutamine transaminase uses the 2-oxo-acids glyoxylate and pyruvate as substrates preferentially. The specificity of *R. etli* glutamine transaminase for different oxo-acids suggests the presence of only one glutamine transaminase with a specificity similar to that found for the mammalian L-form glutamine transaminase (Cooper & Meister, 1981). Glutamine transaminase activity was similar during the different growth stages and under different nutritional conditions, except when a rich medium of PY was used when this activity was low. Although glutamine transaminase is reversible, the presence of ω -amidase activity ensures that the reaction proceeds far in the direction of glutamine utilization. Results obtained suggest that the *R. etli* glutamine transaminase may play a role in the irreversible synthesis of glycine, alanine and other amino acids, and the transamination of these amino acids may contribute to the synthesis of other amino acids to preserve amino acid balance and to prevent loss of essential carbon chains.

Glutaminase

We have also demonstrated the presence of glutaminase activity in *R. etli*. The growth stage and the nutritional conditions influence glutaminase activity. This activity was positively regulated by its substrate glutamine and negatively regulated by ammonium and by the carbon source. The high glutaminase activity found after 12 h of growth when *R. etli* was grown on glutamate plus succinate, may be explained as a result of the high level of glutamine synthesis since under these conditions, *R. etli* exhibits a high level of GS activity (Bravo & Mora, 1988). The decrease in glutaminase activity after 24 h of growth on glutamate plus succinate may be the result of a corresponding reduction in GS activity (Bravo & Mora, 1988). Our results suggest that glutaminase plays a catabolic role in the degradation of glutamine to carbon skeletons and may also play a role in maintaining the balance between glutamate and glutamine, the universal nitrogen donors of the cell. The high glutaminase activity found in bacteroids indicates that glutamine degradation by this enzyme may play an important role during the symbiosis between *R. etli* and *Phaseolus vulgaris*.

The pattern of *R. etli* glutaminase activity during growth correlates with the activity of GS II (Bravo & Mora, 1988;

J. Calderón & L. M. Martínez, unpublished results) except when grown on glutamine as nitrogen and carbon source. These data suggest that glutamine is synthesized and degraded. The higher level of excretion of ammonium on glutamine plus succinate plus MS medium than on glutamine plus succinate medium, supports the fact that when *R. etli* is grown on glutamine plus succinate, the ammonium liberated from glutamine is assimilated by GS, thus leading to the operation of a glutamine cycle that consumes ATP. When grown on glutamine as carbon source, the glutamine cycle operates at a lower rate, thus allowing the use of glutamine as carbon source for growth.

Several functions have been proposed for the glutamine cycle (Calderón *et al.*, 1989; Calderón & Mora, 1985; Cooper & Meister, 1977; Katz & Rognstad, 1976; Mora, 1990): (a) a contribution to the irreversibility of glutamine transamination; (b) a way to rapidly regulate the intracellular glutamine concentration and thus quickly control the rate of synthesis and degradation of cellular nitrogen (since glutamine acts as a co-repressor of nitrogen catabolism); (c) a general way to take up or liberate the carbon skeletons of organic nitrogen metabolites; (d) the turnover of glutamine to glutamate and other amino acids is a way of maintaining the optimal balance among the nitrogenous compounds; (e) for energy dissipation; and (f) to expend energy to induce carbon flow and generate more energy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Leticia Olvera for technical assistance, to Dalia Terrones for amino acid determinations, and to Gisela Du Pont and Isabel Pérez Montfort for critically reviewing the manuscript. This work was supported by DGAPA Grant IN203193 from the Universidad Nacional Autónoma de México and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Bender, R. A., Janssen, K. S., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F. & Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **129**, 1001-1009.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Bravo, A. & Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* **170**, 980-984.
- de Bruijn, F. J., Rossbach, S., Scheider, M., Ratet, P., Mesmer, S., Szeto, W. W., Ausubel, F. M. & Schell, J. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* **171**, 1673-1682.
- Calderón, J. & Mora, J. (1985). Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* **131**, 3237-3242.
- Calderón, J. & Mora, J. (1989). Glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa* growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source. *J Gen Microbiol* **135**, 2699-2707.
- Calderón, J., Morett, E. & Mora, J. (1985). *ω*-Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **161**, 807-809.
- Calderón, J., Cooper, A. J. L., Gelbard, A. S. & Mora, J. (1989). ¹⁵N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **171**, 1772-1774.
- Calderón, J., Martínez, L. M. & Mora, J. (1990). Isolation and characterization of a *Neurospora crassa* mutant altered in the α polypeptide of glutamine synthetase. *J Bacteriol* **172**, 4996-5000.
- Chaney, A. L. & Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for the determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **8**, 130-132.
- Chiurazzi, M., Meza, R., Lara, M., Lahn, A., Defez, R., Iaccarino, M. & Espín, G. (1992). The *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli glnF* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gen* **119**, 1-8.
- Cooper, A. J. L. & Meister, A. (1977). The glutamine transaminase- ω -amidase pathway. *Crit Rev Biochem* **4**, 281-303.
- Cooper, A. J. L. & Meister, A. (1981). Comparative studies of glutamine transaminases from rat tissues. *Comp Biochem Physiol* **69B**, 137-145.
- Darrow, R. A. & Knotts, R. R. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root nodule bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 554-559.
- Donald, R. G. K. & Ludwig, R. A. (1984). *Rhizobium* sp. strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. *J Bacteriol* **158**, 1144-1151.
- Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R. & Iaccarino, M. (1990). A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnF* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol & Gen Genet* **223**, 513-516.
- Fuchs, R. L. & Keister, D. L. (1980). Identifications of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. *J Bacteriol* **141**, 996-998.
- Griffith, O. W. & Meister, A. (1978). Differential inhibition of glutamine and γ -glutamylcysteine synthetase by α -alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem* **253**, 2333-2338.
- Halpern, Y. S. (1988). Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*, pp. 21-58. Edited by S. Sanchez-Esquivel. Boca Raton: CRC Press.
- Hartman, S. C. (1971). Glutaminase and γ -glutamyltransferases. In *The Enzymes*, Vol. 4, 3rd edn, pp. 79-100. Edited by P. D. Boyer. New York: Academic Press.
- Katz, J. & Rognstad, R. (1976). Futile cycles in the metabolism of glucose. *Curr Top Cell Regul* **10**, 237-289.
- Kretovich, V. L., Sidel'nikova, L. I., Kasakova, O. V., Velnova, M. K. & Karyakina, T. I. (1981). Glutaminases and asparaginase of bacteroids from *Rhizobium lupini*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **17**, 821-825.
- Kumar, P. S. & Rao, S. L. N. (1986). Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to *Rhizobium*. *Curr Microbiol* **14**, 221-226.
- Martin, G. B., Chapman, K. A. & Chelm, B. K. (1988). Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J Bacteriol* **170**, 5452-5459.
- Mora, J. (1990). Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* **54**, 293-304.
- Oserio, A., Camarena, L., Salazar, G., Noll-Louzada, M. & Bastarrachea, F. (1993). Nitrogen regulation in a *Escherichia coli* strain with a temperature sensitive glutamyl-tRNA synthetase. *Mol & Gen Genet* **239**, 400-408.
- Prusiner, S. (1973). Glutaminases of *Escherichia coli*: properties,

- regulation and evolution. In *The Enzymes of Glutamine Metabolism*, pp. 293-315. Edited by S. Prusiner & F. R. Stadman. New York: Academic Press.
- Reibach, P. H., Mask, P. L. & Streeter, J. G. (1981). A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can J Microbiol* **27**, 491-495.
- Ronzio, R. A. & Meister, A. (1968). Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**, 164-170.
- Roszbach, S., Sheil, J. & de Bruijn, F. J. (1987). The *ntrC* of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase (GSII) activity, growth on nitrate and chromosomal but not Ti-encoded arginine catabolism pathways. *Mol & Gen Genet* **209**, 419-426.
- Rossi, M., Defez, R., Chiurazzi, M., Lamberti, A., Fuggi, A. & Iaccarino, M. (1989). Regulation of glutamine isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *J Gen Microbiol* **135**, 629-637.
- Segovia, L., Young, P. W. & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 374-377.
- Shatters, R. G., Somerville, J. E. & Kahn, M. L. (1989). Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Bacteriol* **171**, 5087-5094.
- Shatters, R. G., Liu, Y. & Kahn, M. L. (1993). Characterization of a novel glutamine synthetase from *R. meliloti*. *J Biol Chem* **268**, 469-473.
- Smith, E. M. & Watford, M. (1990). Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. *J Biol Chem* **265**, 10631-10636.
- Soberón, M. & González, A. (1987). Glutamine degradation through the *oa* amidase pathway in *Yarrowia mycetozoa*. *J Gen Microbiol* **133**, 9-14.
- Stadtman, E. R. (1973). A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. In *The Enzymes of Glutamine Metabolism*, pp. 1-6. Edited by S. Prusiner & F. R. Stadman. New York: Academic Press.
- Tsupurun, U. L., Zograft, O. N., Orlova, E. V., Keiselev, N. A., Pushkin, A. V., Shiffelova, G. E., Solovieva, N. A., Evstigneeva, S. G. & Kretoovich, W. L. (1987). Electron microscopy of multi forms of glutamine synthetase from bacteroids and the cytosol of yellow lupin root nodules. *Biochim Biophys Acta* **913**, 368-376.
- White, C. (1970). The determination of NH_4 with the use of glutamic dehydrogenase. *Methods Enzymol* **17**, 955.

Received 31 August 1994; revised 21 October 1994; accepted 28 October 1994.

microbiology

Editorial Office

Marlborough House, Basingstoke Road
Spencers Wood, Reading RG7 1AE
United Kingdom

Telephone: (01734) 885577

Fax: (01734) 885656

Paper No. 20005

Dr J Calderón
Instituto de Investigaciones
Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma
de México
Apdo. Postal 70228
México D.F.C.P.04510

14 July 1995

Dear Dr Calderón

The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for publication.

When the paper is sent to press, I will let you know when you can expect to receive the proofs.

Yours sincerely



Ian D M Atherton
Senior Staff Editor

IDMA/SLJ

The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant.

Socorro Durán, Gisela Du Pont, Alejandra Huerta-Zepeda and *Jorge Calderón

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

Running Title: Glutaminase mutant in *Rhizobium etli*.

Subject category: Physiology and Metabolism

Key words: *Rhizobium etli*, mutant, glutaminase, catabolism, and symbiosis.

Abbreviations: PY, peptone yeast medium; Gln, glutamine; Glu, glutamate; suc, succinate; amm, ammonium.

*Correspondence should be sent to:

Dr. Jorge Calderón

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Apdo. Postal 70228

México D.F. C.P. 04510

Telephone Number: 6-22-38-80

Fax Number: 5-50-00-48

E-mail: JFCJ@SERVIDOR.UNAM.MX

ABSTRACT

In order to examine the role of glutaminase in *Rhizobium etli*, we isolated and characterized a *R. etli* glutaminase mutant (LM16). This mutant was selected for its impaired ability to grow on glutamine as nitrogen and carbon source, while retaining the ability to grow on other nitrogen and carbon sources. The mutant showed very low levels of glutaminase activity under various growth conditions in comparison with the wild-type strain. With glutamine as the only nitrogen and carbon source, LM16 showed poor growth, with very high levels of glutamine, low glutamate, and lower ammonium excretion and $^{14}\text{CO}_2$ evolution from [U- ^{14}C]glutamine compared to the wild-type strain. This indicates that the main role of *R. etli* glutaminase is in the use of glutamine as carbon source. *R. etli* glutaminase also plays a role in maintaining the balance between glutamate and glutamine, as shown by the accumulation of glutamine and the low glutamate content of the mutant under different growth conditions. These results also indicate that glutaminase participates in a glutamine cycle in which it degrades glutamine which is then resynthesized by glutamine synthetase. The higher glutamine and lower glutamate content found in bacteroids of LM16 in comparison with bacteroids of the wild-type strain, indicate that glutamine degradation by glutaminase plays an important role during the symbiosis between *R. etli* and *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUCTION

Glutamine plays a central role in the nitrogen metabolism of microorganisms. It is a nitrogen donor for biosynthetic reactions (Stadtman, 1973), and has been proposed as the nitrogen metabolite responsible for nitrogen catabolite repression in several microorganisms (Halpern, 1988). It is synthesized by glutamine synthetase (GS) from ammonium and glutamate. In rhizobia, ammonium assimilation proceeds mainly through the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway (Bravo & Mora, 1988). The family *Rhizobiaceae*, which includes genera such as *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Agrobacterium* is distinct from other bacteria in that its members have at least two forms of GS (Darrow & Knotts, 1977; Fuchs & Keister, 1980; Kumar and Rao, 1986; Tsupurun *et al.*, 1987) with the exception of *Azorhizobium caulinodans* (Donald & Ludwig, 1984). The form termed GSI is structurally and enzymatically typical of prokaryotic GSs, its activity is posttranslationally regulated by reversible adenylation and it appears to be synthesized constitutively (Bravo & Mora, 1988; Rossi *et al.*, 1989). In contrast, GSII is distinct from all other known prokaryotic GSs and is not subject to adenylation; GSII levels are dependent on the nitrogen source present in the medium and it is not expressed in *ntrA* or *ntrC* mutants (Bravo & Mora, 1988; de Bruijn *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1988; Rossbach *et al.*, 1987; Rossi *et al.*, 1989; Shatters *et al.* 1989). A third locus, termed *glnT*, that codes for a GSIII has been identified in *R. meliloti*, *A. tumefaciens* and *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (Chiurazzi *et al.*, 1992; de Bruijn *et al.*, 1989; Espin *et al.*, 1990; Shatters *et al.*, 1993).

In *R. etli*, glutamine is assimilated by transamidation reactions and, in addition, it is converted to 2-oxoglutarate and ammonium by the enzymes of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway (Durán & Calderón, 1995). In this pathway, glutamine is transaminated to yield mainly glycine and alanine and 2-oxoglutarate through the participation of a glutamine transaminase. Subsequently, 2-

oxoglutarate is hydrolysed to 2-oxoglutarate and ammonium by the action of an ω -amidase. Although glutamine transaminase is reversible, the presence of ω -amidase activity ensures that the reaction proceeds in the direction of glutamine utilization. Durán & Calderón (1995) showed that glutamine transaminase activity was similar during the different growth stages and under several nutritional conditions except when a PY-rich medium was used, in which case its activity was low. It has been proposed that *R. etli* glutamine transaminase may play a role in the irreversible synthesis of glycine, alanine and other amino acids, and the transamination of these amino acids may contribute to the synthesis of other amino acids to preserve the amino acid balance and to prevent loss of essential carbon chains (Durán & Calderón, 1995). The glutamine transaminase- ω -amidase pathway has also been found in other microorganisms (Calderón *et al.*, 1985; Soberón & González, 1987; Osorio *et al.*, 1993).

In *R. etli*, glutamine is also degraded by a glutaminase which catalyses its hydrolytic deamidation to glutamate and ammonium (Durán & Calderón, 1995). Glutaminase activity was found to be positively regulated by glutamine, and negatively regulated by ammonium and by the carbon source, and it is high in bacteroids. It has been proposed that glutaminase plays a catabolic role in the degradation of glutamine to carbon skeletons and may also play a role in maintaining the balance between glutamate and glutamine, the universal nitrogen donors of the cell (Durán & Calderón, 1995).

In *R. etli*, the ammonium released from glutamine is assimilated by glutamine synthetase thus leading to the operation of a glutamine cycle where glutamine is synthesized and degraded at the expense of ATP (Durán & Calderón, 1995). This cycle operates at lower rates when grown on glutamine as carbon source, thus allowing the use of glutamine as carbon source for growth (Durán & Calderón, 1995). In *N. crassa*, the glutamine transaminase- ω -amidase pathway has been found to

participate in a glutamine cycle in which this amino acid is continually degraded and resynthesized (Calderón *et al.*, 1989; Calderón & Mora, 1985; Calderón & Mora, 1989). It has been proposed that the glutamine cycle is necessary for carbon utilization by this microorganism (Mora, 1990).

Since *R. etli* glutaminase is an important enzyme in glutamine catabolism, linking nitrogen metabolism with carbon metabolism, we describe here the isolation and characterization of an *R. etli* mutant with altered glutaminase activity.

METHODS

Strains and plasmid. The *Rhizobium etli* CFN42 wild type strain, previously classified as *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli (Segovia *et al.*, 1993) and *E. coli* S17-1 strain carrying the *tra* gene region of RP4 integrated in the chromosome and the suicide vector pSUP5011 containing the Tn5-Mob (Simon, 1983), were used in this study.

Growth conditions. Batch cultures of *R. etli* were grown at 30°C and with shaking at 200 rpm. For growth on minimal medium (MM) (Beringer, 1974), cells previously grown overnight on a rich medium (PY) containing 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, and 7 mM CaCl₂ were washed and used as inoculum. The initial optical density of the medium was adjusted to 0.05 at 540 nm. The nitrogen and carbon sources in MM were used at 10 mM. Growth was monitored by measurement of the optical density at 540 nm and by protein determination using the Lowry method.

Tn5 mutagenesis. The *Escherichia coli* strain S17-1 was used to transfer the suicide vector pSUP5011 carrying transposon Tn5-Mob to *R. etli* CFN42 strain. Kanamycin transconjugants were isolated on PY medium containing this antibiotic (30 µg ml⁻¹) plus nalidixic acid (20 µg ml⁻¹).

Determination of glutaminase activity. Cell extracts were prepared by sonicating whole cells in extraction buffer (100 mM KH₂PO₄, pH 8) with a Soniprep 150 ultrasonic disintegrator; the homogenates were centrifuged for 2 min at room temperature in a microcentrifuge. The activity was assayed in a 0.25 ml reaction mixture containing 30 mM KH₂PO₄ pH 8, 10 mM glutamine and 0.05 ml of cell extract. Ammonium formation was measured as described elsewhere (Chaney & Marbach, 1962; Durán & Calderón, 1995).

Determination of glutamine synthetase activity. Glutamine synthetase activity was assayed with cell extracts prepared by sonicating the cells in 10 mM imidazole hydrochloride and 0.5 mM EDTA (pH

7.0). Glutamine synthetase was measured by its synthetase activity as described by Bender (1977). Glutamine synthetase I and II were distinguished by their different heat stabilities on heating at 50 °C for 1 hour as described by Darrow & Knots (1977).

Determination of nitrogenase activity. Nitrogenase activity was determined by measuring acetylene reduction. The flasks containing the nodules were sealed with rubber stoppers, acetylene was injected at a final concentration of 10% of the gas phase, and ethylene production was determined by gas chromatography (Bravo *et al.*, 1988).

Ammonium determination. Ammonium concentration in samples of media was measured with an Orion electrode (Calderón & Mora, 1989).

Measurement of $^{14}\text{CO}_2$ from [U- ^{14}C]glutamine. Samples of cultures were incubated with [U- ^{14}C]glutamine [0.2 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ (7.5 kBq ml^{-1})]. Released CO_2 was absorbed in 2.5 M NaOH and radioactivity was measured as described elsewhere (Mora *et al.*, 1972).

Determination of amino acid pools. Cells were harvested by centrifugation, suspended in 5 ml of 80 % (v/v) ethanol and heated at 90 °C for 10 min. They were then removed by centrifugation and the supernatant containing the free amino acids was lyophilised and then resuspended in distilled water. The amino acids were determined with a System Gold Liquid Chromatographic system (Beckman) and a Gilson Fluorometer (model 121) after coupling with *o*-phthalaldehyde (Calderón *et al.*, 1985).

Plant test. The seeds were surface-sterilized in 5 % hypochlorite and germinated on moist sterile paper for three days. The seedlings were transferred to plastic growth pots containing vermiculite and Jensen's medium (Gibson, 1980). After six days, the seedlings were inoculated with distilled water-washed bacteria grown on PY medium with appropriate antibiotics. Bacteria were reisolated from the

surface-sterilized nodule and individual nodules were crushed and spread onto PY plates. Individual colonies were scored for antibiotic resistance and nutritional phenotype

Bacteroid isolation. Bacteroids from root nodules of *Phaseolus vulgaris* were isolated using self-generating Percoll gradients as described by Reibach *et al.* (1981). A crude extract was prepared by gently crushing 6 g of nodules with a mortar and pestle in 15 ml of grinding buffer (150 mM NaCl and 50 mM KH_2PO_4 pH 7.6). The crude homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and the residue washed with additional grinding buffer. The filtered crude extract was centrifuged for 5 minutes at 3 000 rpm (Beckmann Instrument Co. JA-20 fixed angle rotor) at 4 °C, the supernatant was centrifuged again for 15 min at 15 000 rpm and the pellet resuspended in 2 ml of grinding buffer. A 50 ml polycarbonate centrifuge tube was filled with 24.5 ml Percoll concentrate, 3.5 ml 500 mM KH_2PO_4 plus 1.5 M NaCl (pH 7.6) and 7 ml distilled H_2O giving a final concentration of 70% Percoll. One ml of extract was layered on the top of the gradient. The tube was centrifuged for 50 min at 20 000 rpm. The bacteroids were collected by suction with a Pasteur pipette. Percoll was removed by diluting the bacteroid fraction 1:10 with 150 mM NaCl and 50 mM KH_2PO_4 pH 7.6, and centrifuged for 20 min at 15 000 rpm. The pellet was resuspended in 2 ml of extraction buffer.

Reproducibility of results. The experiments reported were each repeated at least once; representative results are shown.

RESULTS

Isolation of the LM16 mutant

Mutants of *R. etli* were obtained by general Tn5 mutagenesis with plasmid pSUP5011. Approximately 100 000 kanamycin-resistant transconjugants were obtained, then collected with PY medium. To enrich for mutants unable to grow on glutamine as nitrogen and carbon source, this suspension was used to inoculate MM medium supplemented with glutamine and with 200 µg ml⁻¹ ampicillin and grown for 48 hours changing the medium each 12 hours. The cells were then spread on PY kanamycin plates, 2 500 colonies which appeared after 3 days were replica plated to MM agar containing ammonium plus succinate, glutamine plus succinate or glutamine. Forty three mutants which failed to grow on glutamine as nitrogen and carbon source were purified and replica plated again in the same medium and on MM plates containing glutamate plus succinate and glutamate as nitrogen and carbon source. The LM16 mutant was the only one unable to grow on glutamine as nitrogen and carbon source and able to grow on the other media tested.

Growth and glutaminase activity

The LM16 mutant grew very poorly on glutamine as nitrogen and carbon source, whereas on glutamine as nitrogen source and succinate as carbon source or in other media such as PY, ammonium plus succinate, and glutamate or asparagine with or without succinate it grew as well as the wild-type strain (Fig. 1).

Since we have previously found that glutaminase was the highest degradative enzyme activity when *R. etli* was grown on glutamine as nitrogen and carbon source (Durán & Calderón, 1995), we examined the LM16 glutaminase activity under different nutritional conditions. It was found that in comparison with the wild-type strain, the mutant had very low levels of glutaminase activity under the

different conditions tested being about ten times lower when grown on glutamine with succinate [86 versus 7 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹] or without succinate [85 versus 8 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹] and five times lower when grown on ammonium plus succinate [30 versus 6 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹]

Glutamine content, glutamate content and glutamine synthetase activities

Since the low glutaminase activity observed in the LM16 mutant should result in an impairment of the catabolism of glutamine to glutamate, we measured the intracellular glutamine and glutamate pools in LM16 under different growth conditions. In comparison with the wild-type strain, LM16 showed a 53-fold higher glutamine and a 3-fold lower glutamate content when grown on glutamine as nitrogen and carbon source, a 6-fold higher glutamine and a 2-fold lower glutamate content when grown on glutamine plus succinate, a 2-fold higher glutamine and a 3-fold lower glutamate content when grown on ammonium plus succinate and a 2-fold higher glutamine and similar glutamate content when grown on PY-rich medium (Table 1). This result indicates that the inability of LM16 to grow on glutamine as nitrogen and carbon source is not due to the lack of transport of this amino acid.

In order to know if the glutamine synthetase I and II activities were altered in the mutant, since it accumulates glutamine due to the decrease of glutamine degradation through glutaminase, we measured these activities under different growth conditions. We found that glutamine synthetase I and II activities in the mutant were similar to the wild-type strain when both strains were grown on ammonium plus succinate or glutamine with or without succinate (data not shown).

Ammonium excretion, and the release of ¹⁴CO₂ from [U-¹⁴C] glutamine

We have found that *R. etli* excretes ammonium when grown on glutamine with or without succinate (Durán & Calderón, 1995). To test the participation of glutaminase in this excretion, we measured the ammonium released by LM16 and the wild-type strain under these conditions. Fig. 2 shows that the

mutant excreted 2-fold lower amounts of ammonium than the wild type strain, after 24 hours of growth on glutamine plus succinate, whereas on glutamine as nitrogen and carbon source, after 24 hours the mutant excreted 7-fold lower ammonium than the wild-type strain.

To evaluate the participation of glutaminase in the utilization of glutamine as carbon source, we measured the $^{14}\text{CO}_2$ released from [U- ^{14}C] glutamine by the LM16 mutant and wild-type strain under different growth conditions. Fig. 3 shows that, compared with the wild type strain, the mutant liberates similar amounts of $^{14}\text{CO}_2$ per milligram of protein per hour when it was grown on ammonium plus succinate or on glutamine plus succinate, whereas on glutamine as nitrogen source, the mutant liberates amounts of $^{14}\text{CO}_2$ per milligram of protein per hour 2-fold lower than the wild-type strain.

Symbiotic phenotype

To analyse the role of glutaminase in the degradation of glutamine in bacteroids, *R. etli* wild-type strain and LM16 mutant bacteroids were isolated using a self-generating Percoll gradient (Reibach *et al.*, 1981), and the glutamine and glutamate content were determined. The mutant contained 9-fold higher glutamine (14.0 versus 1.5 nmol g nodule⁻¹) and about 2-fold lower glutamate (65.5 versus 112.1 nmol g nodule⁻¹). These results indicate that glutaminase is active in bacteroids degrading glutamine to glutamate. We found that the LM16 mutant nodulates as well as the wild-type strain and that the nitrogenase level was similar to the wild-type strain (data not shown).

DISCUSSION

The LM16 mutant was selected for its inability to grow on glutamine as nitrogen and carbon source and its ability to grow on glutamine plus succinate or ammonium plus succinate. The fact that LM16 is only affected in its capacity to grow on glutamine as nitrogen and carbon source (Fig. 1), indicates that this amino acid is transported and that the metabolic block is in the degradation of glutamine.

The LM16 mutant is altered in its glutaminase activity as shown by the low levels of activity found under different growth conditions. The low constitutive glutaminase activity found in the mutant may be explained by the presence of other glutaminase, as has been found in *E. coli*, where two forms exist: glutaminase A that is controlled by nitrogen metabolites and cyclic AMP, and glutaminase B that is its activity is low constitutive (Prusiner, 1973), although it cannot be excluded that the mutation was in a regulatory gene.

The main role of *R. elli* glutaminase is to use glutamine as carbon source as shown by: (a) the poor growth of the mutant when glutamine was the only nitrogen and carbon source (Fig. 1), (b) the very high glutamine and low glutamate content of this mutant under this condition (Table 1) and (c) the lower ammonium excretion (Fig. 2) and $^{14}\text{CO}_2$ evolution from $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamine of LM16 on glutamine as nitrogen and carbon source, in comparison with the wild-type strain (Fig. 3). The slow growth of LM16 on glutamine as nitrogen and carbon source (Fig. 1) as well as the fact that the excretion of ammonium (Fig. 2) and the $^{14}\text{CO}_2$ released from $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamine of this mutant under this condition (Fig. 3) are not totally impaired, indicate that other pathways participate in the degradation of glutamine, but those did not compensate for the lack of glutaminase activity of the LM16 mutant under this condition. In addition, however glutaminase plays a role in the use of glutamine as nitrogen source.

This is shown by: (a) the high glutamine and low glutamate content of this mutant on glutamine plus succinate (Table 1) and (b) the decrease of the ammonium excretion of the mutant under the same condition (Fig. 2). It may also play a role in maintaining the balance between glutamate and glutamine, as shown by the accumulated glutamine and low glutamate content of the mutant on ammonium plus succinate and PY-rich medium (Table 1). These results also indicate that under these conditions glutaminase participates in a glutamine cycle where this amino acid is degraded by this enzyme and synthesized again by glutamine synthetase. We expected that the decrease of the degradation of glutamine through glutaminase might result in a lower activities of the enzymes that participate in its synthesis, nevertheless the glutamine synthetase I and II activities were similar in the LM16 mutant and the wild-type strain. This result may be explained by the participation of other pathways in the degradation of glutamine that compensate the lack of glutaminase activity, thus LM16 releases similar amounts of $^{14}\text{CO}_2$ from $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamine on ammonium plus succinate.

The higher glutamine content and lower glutamate content found in bacteroids of LM16 in comparison with bacteroids of the wild-type strain, indicate that glutamine degradation by glutaminase plays an important role during the symbiosis between *R. etli* and *Phaseolus vulgaris*. Nevertheless the lack of glutaminase in the mutant is not reflected in the nitrogenase activity; this may be due to the presence of other glutamine-degradating enzymes that compensate for the lack of glutaminase activity (Durán & Calderón, 1995).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Luz Maria Martínez for technical assistance, to O. Ladrón de Guevara, L. García, and P. Padilla for amino acid determinations, and to Isabel Pérez Montfort for critical review of the manuscript.

This work was supported by DGAPA Grant IN203193 from the Universidad Nacional Autónoma de México and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología..

REFERENCES

- Bender, R. A., Janssen, K. S., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F. & Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **129**, 1001-1009.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Bravo, A., Becerril, B. & Mora, J. (1988). Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* gene into *Rhizobium phaseoli*: effect on nitrogen fixation. *J Bacteriol* **170**, 985-988.
- Bravo, A. & Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* **170**, 980-984.
- Calderón, J., Cooper, A. J. L., Gelhard, A. S. & Mora, J. (1989). ¹⁵N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **171**, 1772-1774.
- Calderón, J. & Mora, J. (1985). Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* **131**, 3237-3242.
- Calderón, J. & Mora, J. (1989). Glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa* growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source. *J Gen Microbiol* **135**, 2699-2707.
- Calderón, J., Morett, E. & Mora, J. (1985). ω -Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **161**, 807-809.
- Chaney, A. L. & Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for the determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **8**, 130-132.

- Chiurazzi, M., Meza, R., Lara, M., Lahn, A., Defez, R., Iaccarino, M. & Espín, G. (1992).** The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III *Gene* **119**, 1-8.
- Darrow, R. A. & Knotts, R. R. (1977).** Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 554-559.
- de Bruijn F. J., Rossbach, S., Scheider, M., Ratet, P., Mesmer, S., Szeto, W. W., Ausubel, F. M & Schell, J. (1989).** *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* **171**, 1673-1682.
- Donald, R. G. K. & Ludwig, R. A. (1984).** *Rhizobium* sp strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. *J Bacteriol* **158**, 1144-1151.
- Durán, S. & Calderón, J. (1995).** Role of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology* **141**, 589-595.
- Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R. & Iaccarino, M. (1990).** A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Gen Genet* **223**, 513-516.
- Fuchs, R. L. & Keister, D. L. (1980).** Identifications of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. *J Bacteriol* **141**, 996-998.
- Gibson A. II (1980)** Method for legumes in glass house and controlled environment cabinets. In *Methods for evaluation biological nitrogen fixation*, pp. 139-185. Edited by Bergersen F. J. John Wiley and sons, Inc., New York,

- Halpern Y. S. (1988).** Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In *Nitrogen source control of microbial processes*, pp. 21-58. Edited by S. Sanchez-Esquivel. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Kumar, P. S. & Rao, S. L. N. (1986).** Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to Rhizobia. *Curr Microbiol* **14**, 221-226.
- Martin, G. B., Chapman, K. A. & Chelm, B. K. (1988).** Role of the *Bradyrhizobium japonicum* *ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J Bacteriol* **170**, 5452-5459.
- Mora, J. (1990).** Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* **54**, 293-304.
- Mora, J., Salceda, R. & Sánchez, S. (1972).** Regulation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase by carbon and nitrogen source. *J Gen Microbiol* **118**, 455-463.
- Osorio, A., Camarena, L., Salazar, G., Noll-Louzada, M. & Bastarrachea, F. (1993).** Nitrogen regulation in a *Escherichia coli* strain with a temperature sensitive glutamyl-tRNA synthetase. *Mol Gen Genet* **239**, 400-408.
- Prusiner, S. (1973).** Glutaminases of *Escherichia coli*: properties, regulation and evolution. In *The enzymes of glutamine metabolism*, pp. 293-315. Edited by S. Prusiner and E. R. Stadtman. New York Academic Press.
- Reibach, P. H., Mask, P. L. & Streeter, J. G. (1981).** A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can. J Microbiol* **27**, 491-495.

- Rosbach, S., Shell, J. & de Bruijn, F. J. (1987). The *nrc*⁺ of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase (GSII) activity, growth on nitrate and chromosomal but not Ti-encode arginine catabolism pathways. *Mol Gen Genet* **209**, 419-426.
- Rossi, M., Defez, R., Chiurazzi, M., Lamberti, A., Fuggi, A. & Iaccarino, M. (1989). Regulation of glutamine isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Gen Microbiol* **135**, 629-637.
- Segovia, L., Young, P. W. & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 374-377.
- Shatters, R. G., Liu, Y. & Kahn, M. L. (1993). Characterization of a novel glutamine synthetase from *R. meliloti*. *J Biol Chem* **268**, 469-475.
- Shatters, R. G., Somerville, J. E. & Kahn, M. L. (1989). Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Bacteriol* **171**, 5087-5094.
- Simon, R. (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet* **196**, 413-420.
- Soberón, M. & González, A. (1987). Glutamine degradation through the ω -amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **133**, 9-14.
- Stadtman, E. R. (1973). A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. In *The enzymes of glutamine metabolism*, pp. 1-6. Edited by S. Prusiner and E. R. Stadtman. New York Academic Press.
- Tsupurun, U. L., Zograft, O. N., Orlova, E. V., Keiselev, N. A., Pushkin, A. V., Shiffelova, G. E., Solovieva, N. A., Evstigneeva, S. G. & Kretovich, W. L. (1987). Electron microscopy of multi forms of glutamine synthetase from bacteroids and the cytosol of yellow Lupin root nodules. *Biochem Biophys Acta* **913**, 368-376.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Growth curves of *R. etli* wild type strain (closed symbols) and LM16 mutant (open symbols) on: (A) glutamine plus succinate (●, ∇) and glutamine (▼, □); (B) PY (●, ∇) and ammonium plus succinate (▼, □); (C) glutamate plus succinate (●, ∇) and glutamate (▼, □); (D) asparagine plus succinate (●, ∇) and asparagine (▼, □).

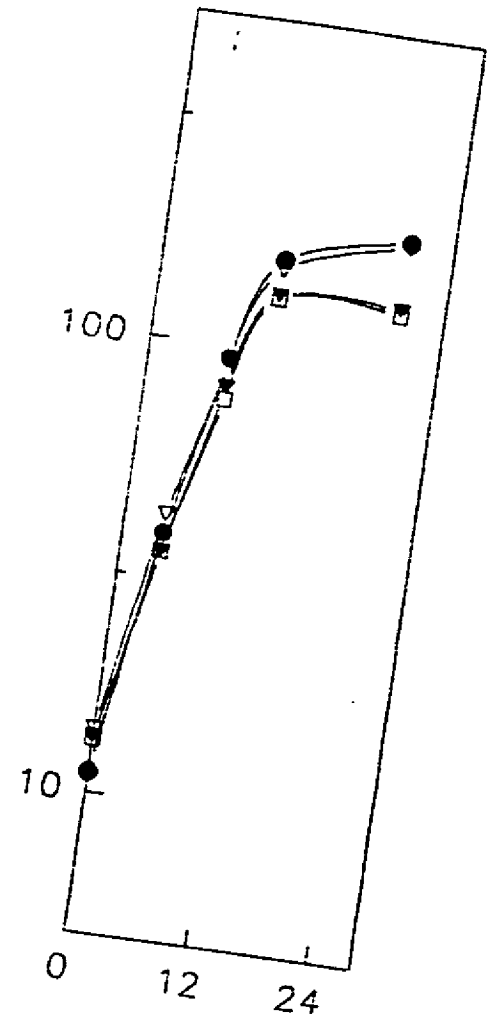
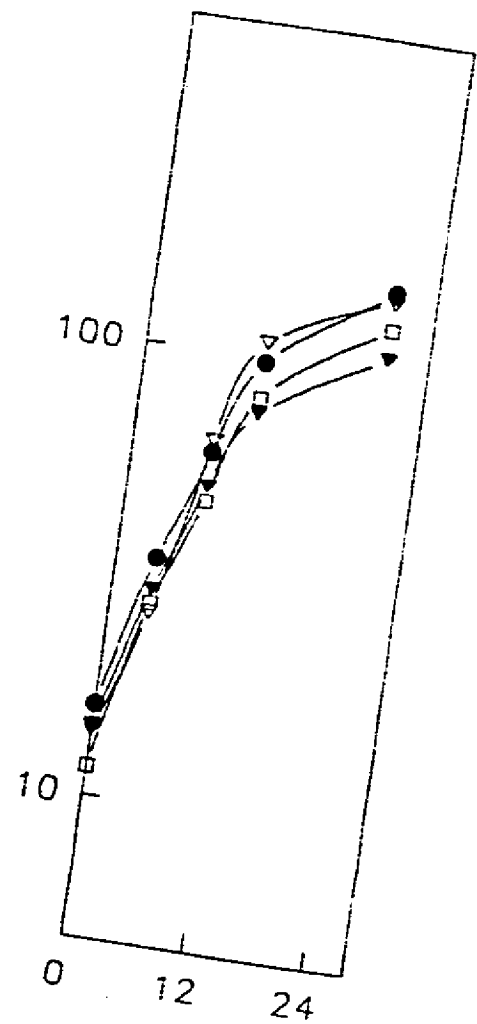
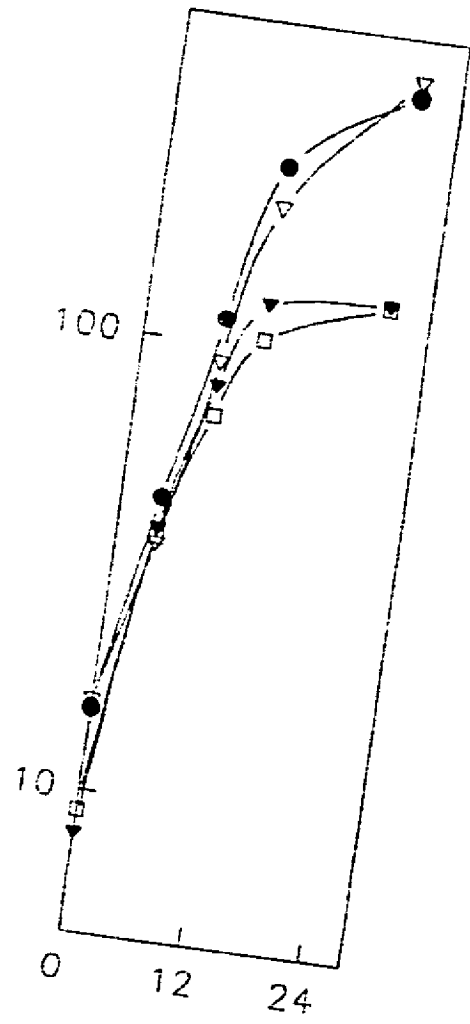
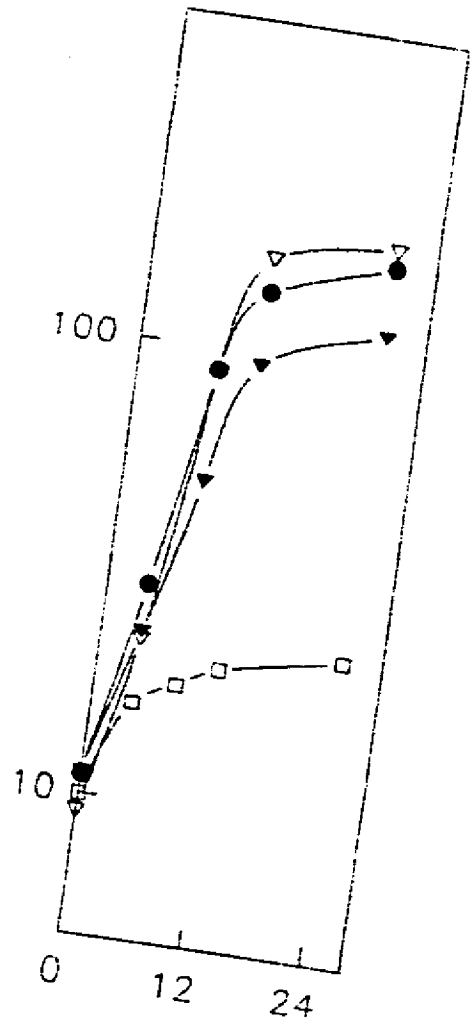
Fig. 2. Ammonium excretion by the *R. etli* wild-type strain (●) and LM16 mutant (∇) growing on glutamine plus succinate (A) or on glutamine (B).

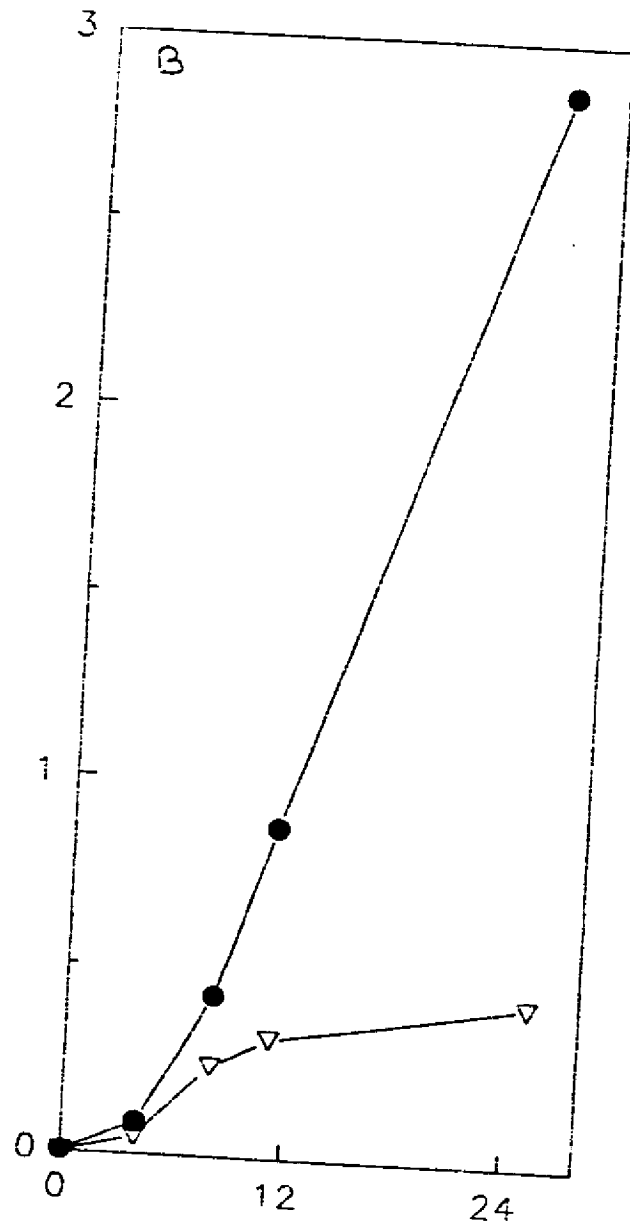
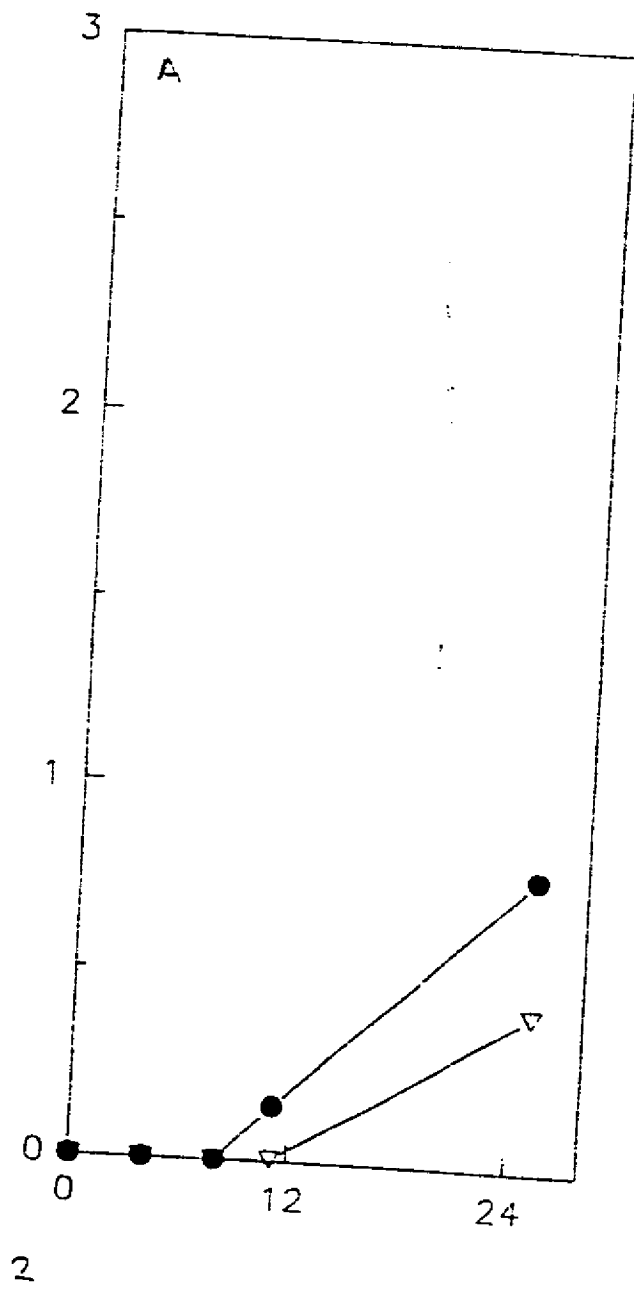
Fig. 3. $^{14}\text{CO}_2$ release by *R. etli* wild-type strain (□) and LM16 mutant (▨) under different growth conditions.

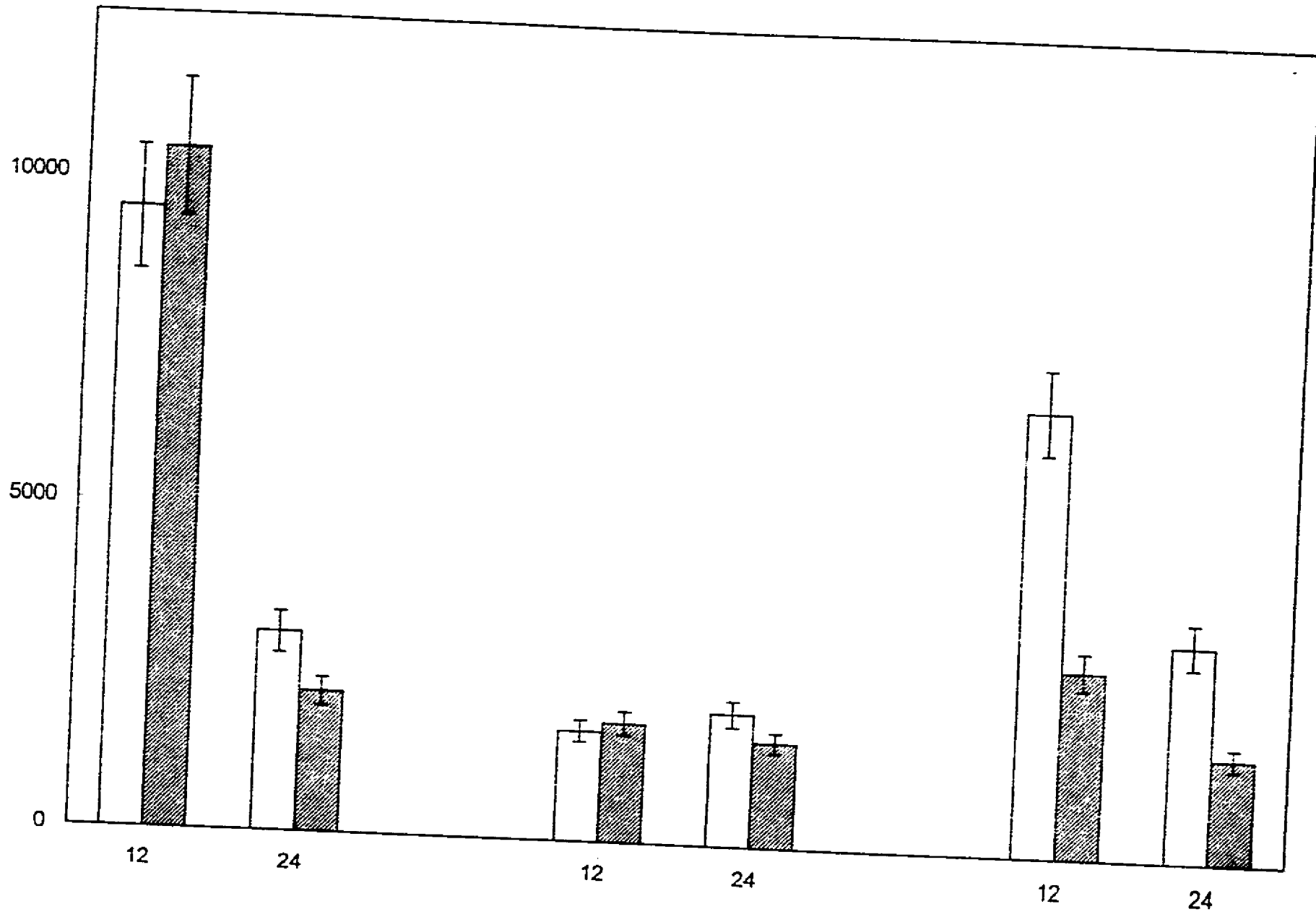
Table 1. Glutamine and glutamate content of *R. etli* wild-type strain and LM16 mutant grown on different conditions.

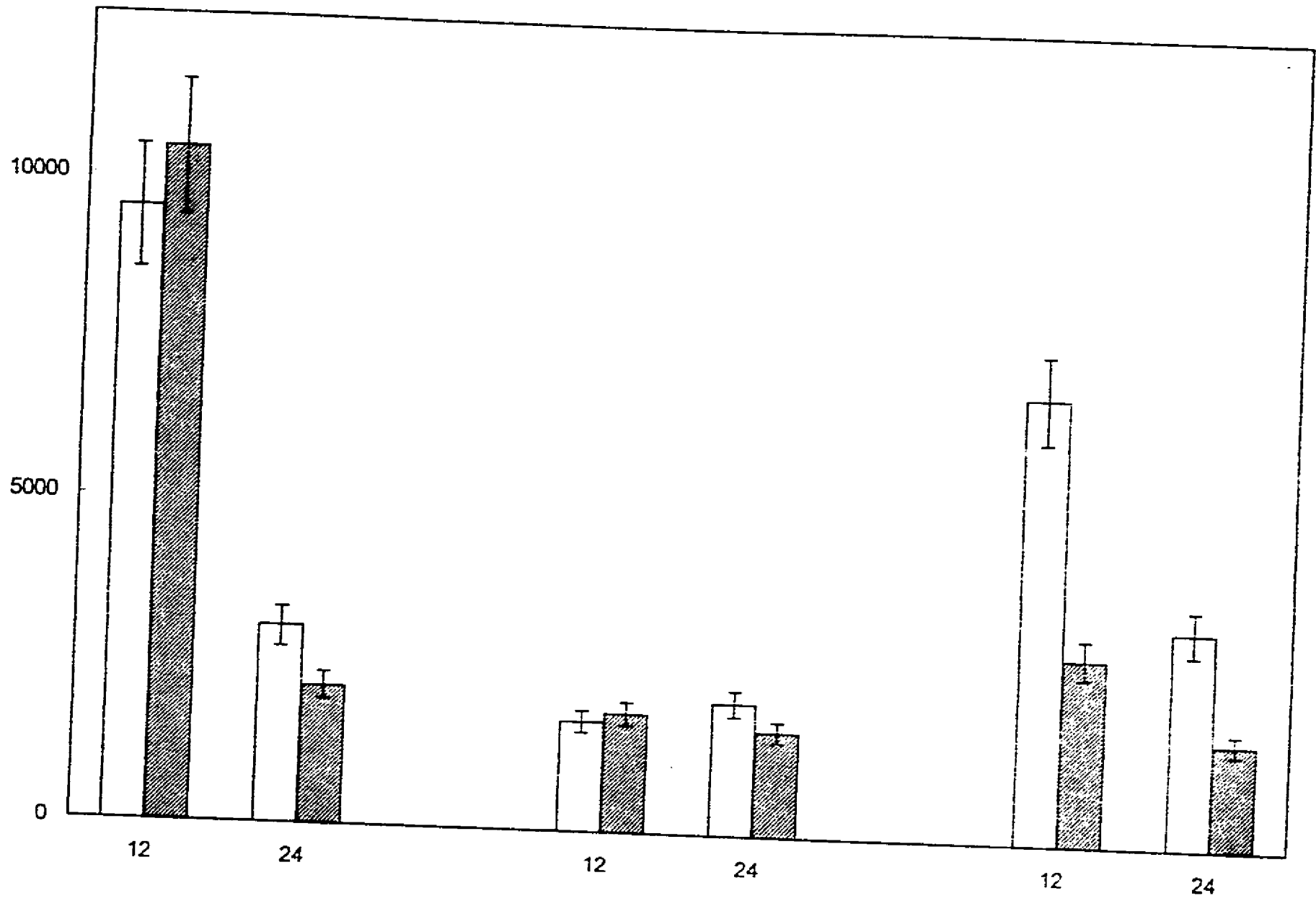
Growth condition	Wild-type		LM16	
	Gln	Glu	Gln	Glu
Gln	0.9	21.5	48.0	6.6
Gln + suc	0.6	27.5	3.3	15.6
Amm + suc	0.4	16.1	0.9	5.5
PY	0.4	22.3	0.8	18.8

Amino acid content was determined after 5 hours of growth and is expressed as nmoles per mg of protein









RESULTADOS ADICIONALES

Para clonar el gene que complementa la mutación de la cepa LM16, se realizó una conjugación triparental entre la cepa LM16, la cepa HB101 de *E. coli* que lleva el banco genómico de *R. etli* (construido por el Dr. J. Calderón) y el ayudador pRK2073. Se obtuvieron 20 cepas transconjugantes capaces de crecer en glutamina como fuente de carbono y de nitrógeno. De dichas cepas se seleccionaron 10, de las cuales se extrajo el DNA del plásmido para transformar *E. coli*. Solo se obtuvieron colonias de 7 transformaciones.

Para descartar que se tratara de revertantes de la mutación en la cepa LM16, se realizó otra conjugación triparental entre la cepa LM16, las 7 cepas transformadas de *E. coli* y el ayudados pRK2073. Sólo se obtuvieron 2 transconjugantes capaces de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno llamadas, RLM16/pCD24 y RLM16/pCD28. El patrón de restricción de los plásmidos pCD24 y pCD28 muestra que comparten algunas bandas.

Para analizar si el plásmido pCD24 o el pCD28 llevan clonado el gene que codifica para la glutaminasa, se determinó la actividad de esta enzima en la cepas complementadas (Fig. 2). Los resultados muestran que estas cepas tienen 2 o 3 veces más actividad de glutaminasa que la cepa silvestre (solo se continuó trabajando con el plásmido pCD24).

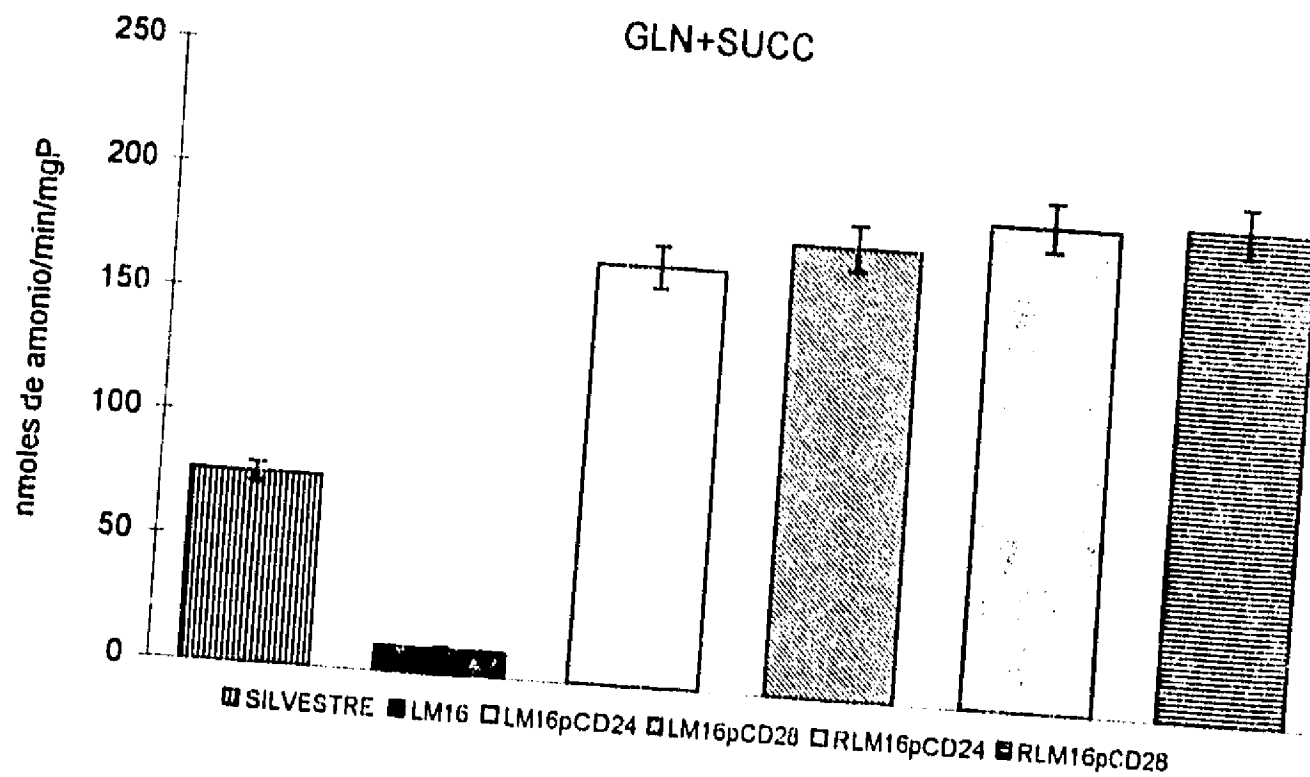


Fig. 2. Determinación de la actividad de la glutaminasa en las cepas que complementan la mutación de la cepa LM16.

Para analizar si el plásmido pCD24 contiene el gene estructural de la glutaminasa, se realizó una conjugación triparental entre el plásmido pCD24, la cepa silvestre de *R. meliloti* y el ayudador pRK2073, así se obtuvo la transconjugante Rm/pCD24. Esta cepa mostró una actividad de glutaminasa más alta que la cepa silvestre de *R. meliloti* (Fig. 3).

También se realizó otra conjugación entre la cepa silvestre de *R. etli*, el plásmido pCD24 y el ayudador pRK2073. Se obtuvo la transconjugante CE3/pCD24.

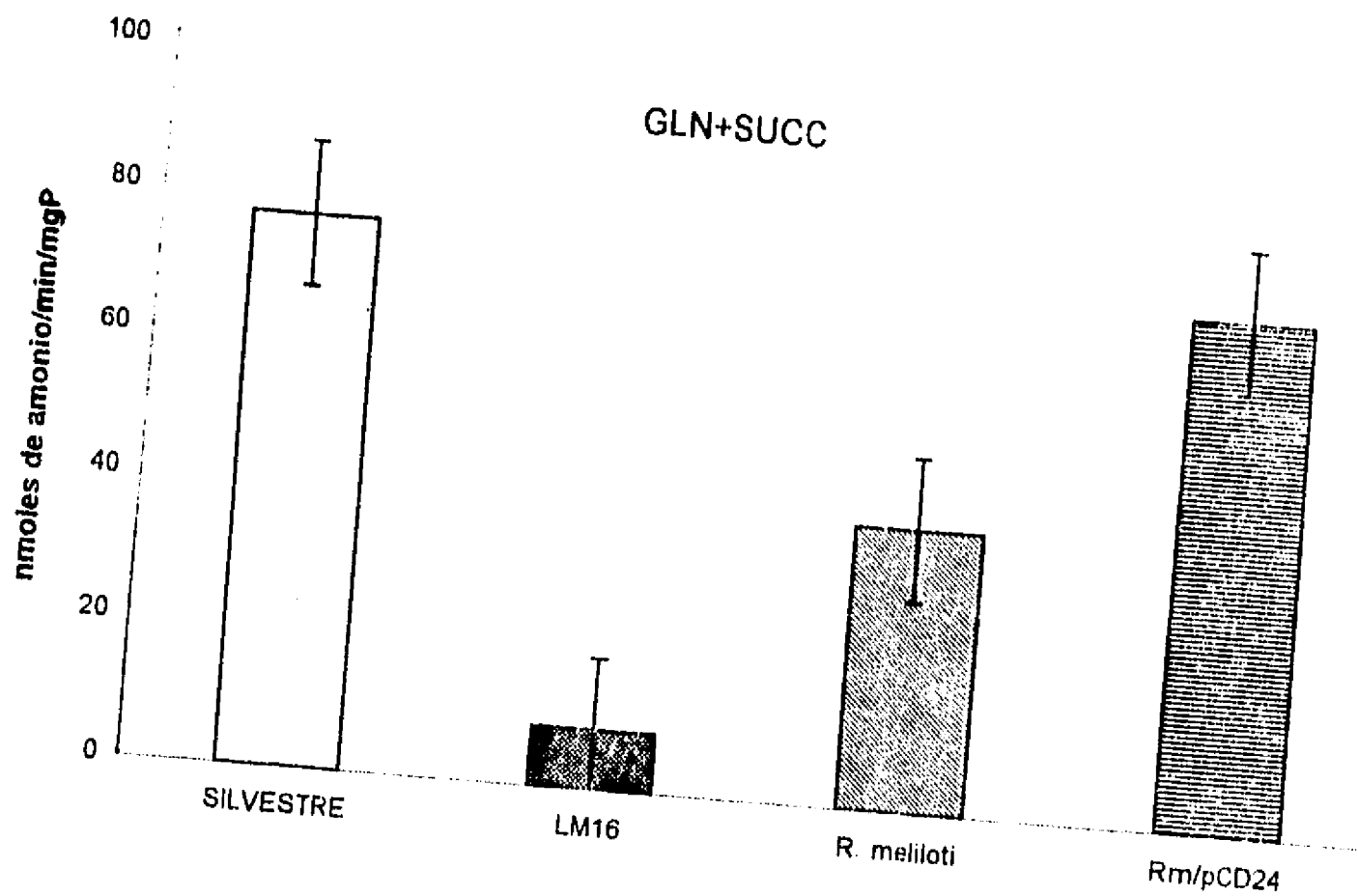


Fig. 3. Actividad de la glutaminasa en *Rhizobium meliloti*.

Para conocer la regulación de la glutaminasa en las cepas complementadas con el plásmido pCD24 (CE3/pCD24 y RLM16/pCD24), se determinó la actividad de esta enzima en medios mínimos suplementados con amonio más succinato, glutamina más succinato y en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 4). Los resultados muestran que la actividad de glutaminasa en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 es mayor que en la cepa silvestre y que la enzima se regula de manera similar.

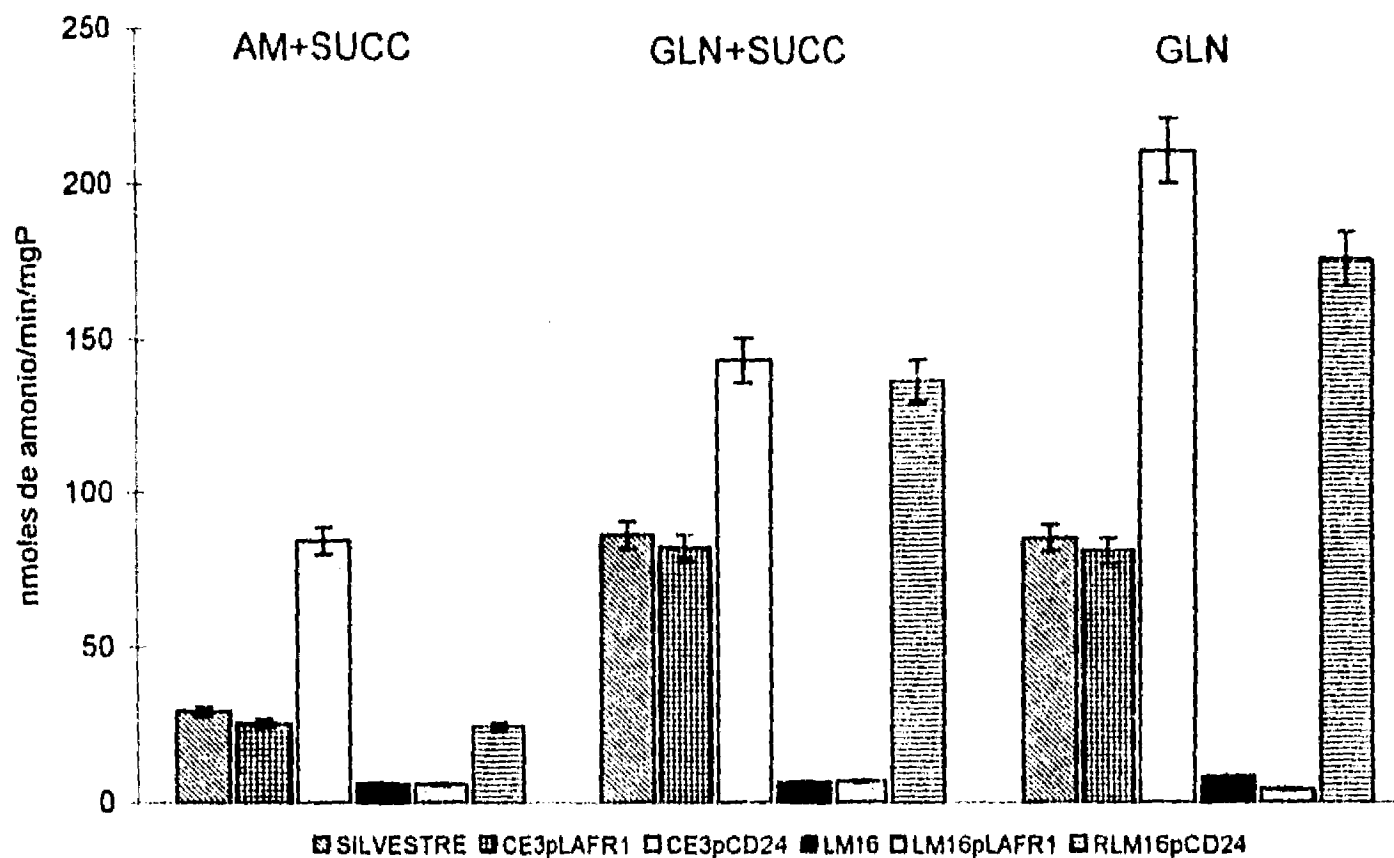


Fig. 4. Actividad de la glutaminasa en la cepa silvestre de *R. etli*, en la cepa LM16 y en las cepas con el plásmido pCD24.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de la glutaminasa en el crecimiento de las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24, se determinó una cinética de crecimiento en diversas condiciones (Fig. 5). Los resultados muestran que las cepas que sobreexpresan la actividad de la glutaminasa crecen de manera similar a la cepa silvestre.

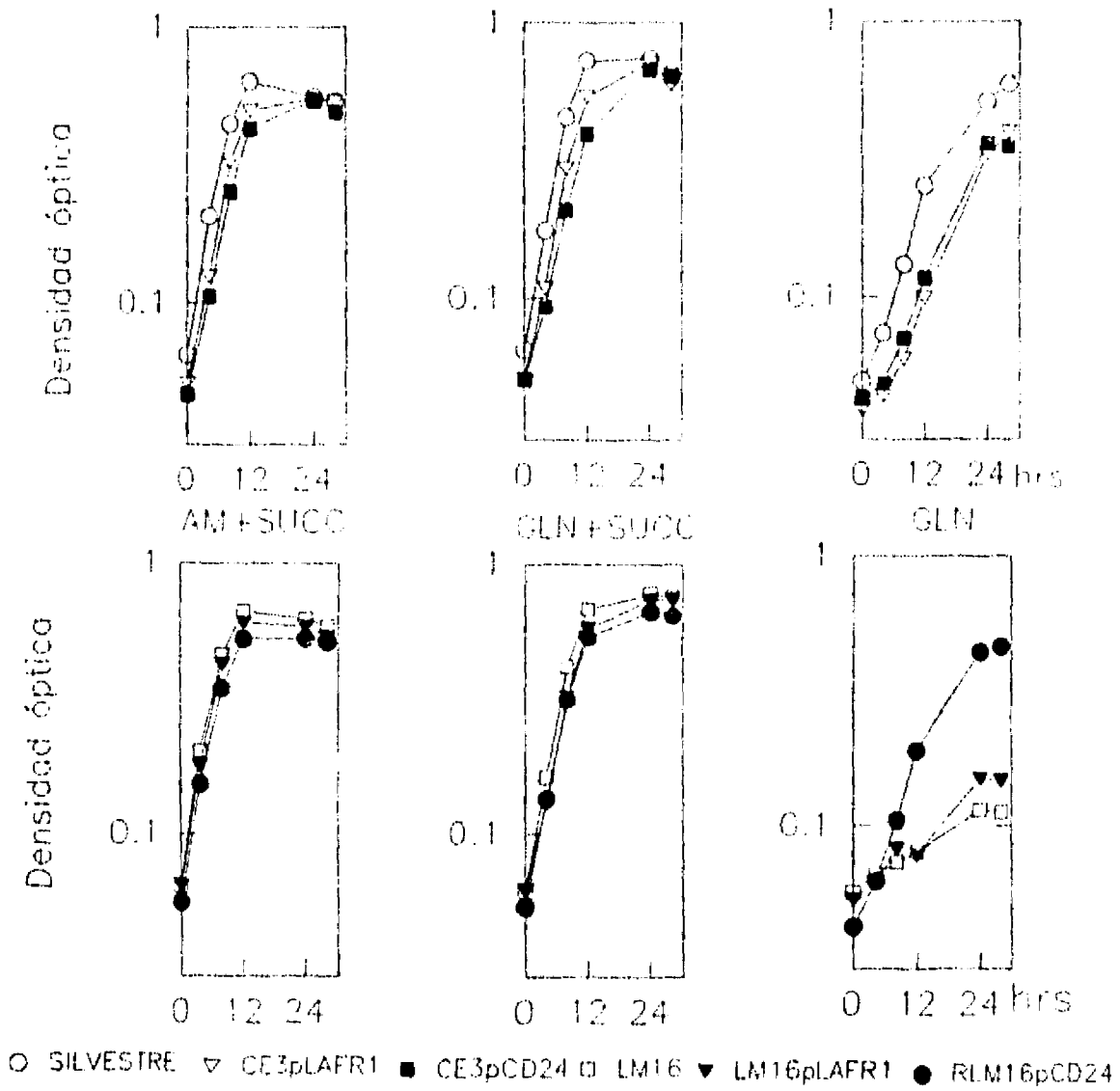


Fig. 5. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre de *R. etli*, de la cepa LM16 y de las cepas con el plásmido pCD24.

Cuando *R. etli* crece en un medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno tiene un tiempo de duplicación menor que cuando crece en un medio mínimo suplementado con glutamina más succinato. El hecho de que la

transconjugante CE3/pCD24 crezca de manera similar a la cepa silvestre, sugiere que la actividad de esta enzima no es la que limita el crecimiento en esta condición.

El hecho de que en un medio mínimo suplementado con amonio más succinato, la transconjugante CE3/pCD24 crezca de manera similar a la cepa silvestre, sugiere que la mayor degradación de la glutamina es compensada por una mayor síntesis o que la glutaminasa podría estar regulada alostéricamente de tal manera que no se encuentra tan activa *in vivo* como cuando se determinó *in vitro*.

Para conocer el efecto de la disminución y de la sobreexpresión de la actividad de la glutaminasa, sobre la síntesis y la asimilación de la glutamina, se determinaron las actividades de las GSs I y II y de la GOGAT en la cepa LM16 y en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 (Figs. 6 y 7). Los resultados muestran que la actividad de las GSs I y II en la cepa LM16 son similares a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que posiblemente otras enzimas como la GOGAT o la transaminasa de glutamina- ω -amidasa compensan la baja actividad de la glutaminasa en la cepa LM16.

La actividad de las GSs I y II en las cepas con el plásmido pCD24 también son similares a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que las actividades de la glutamino sintetasa I y II podrían estar reguladas alostéricamente. De tal manera que aunque los niveles de estas enzimas no varían en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24, su actividad *in vivo* puede ser diferente y compensar la alta actividad de la glutaminasa. También podría deberse a que la glutaminasa podría estar regulada

alostéricamente de tal manera que aunque los niveles de esta enzima son más altos en las cepas transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24, su actividad *in vivo* puede ser similar a la cepa silvestre.

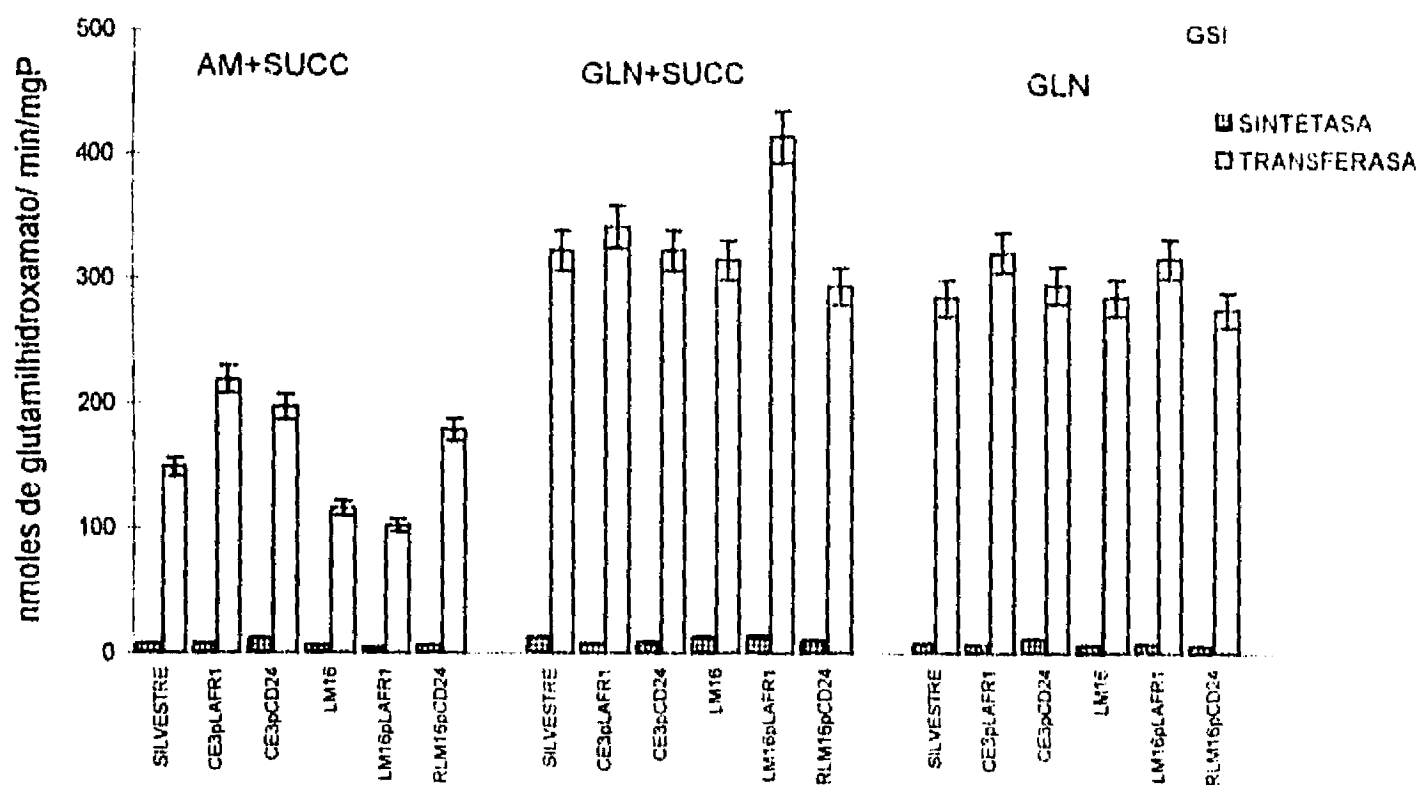


Fig. 6. Actividad de la glutamino sintetasa I en la cepa silvestre de *R. etli*, en la cepa LM16 y en las cepas con el plásmido pCD24.

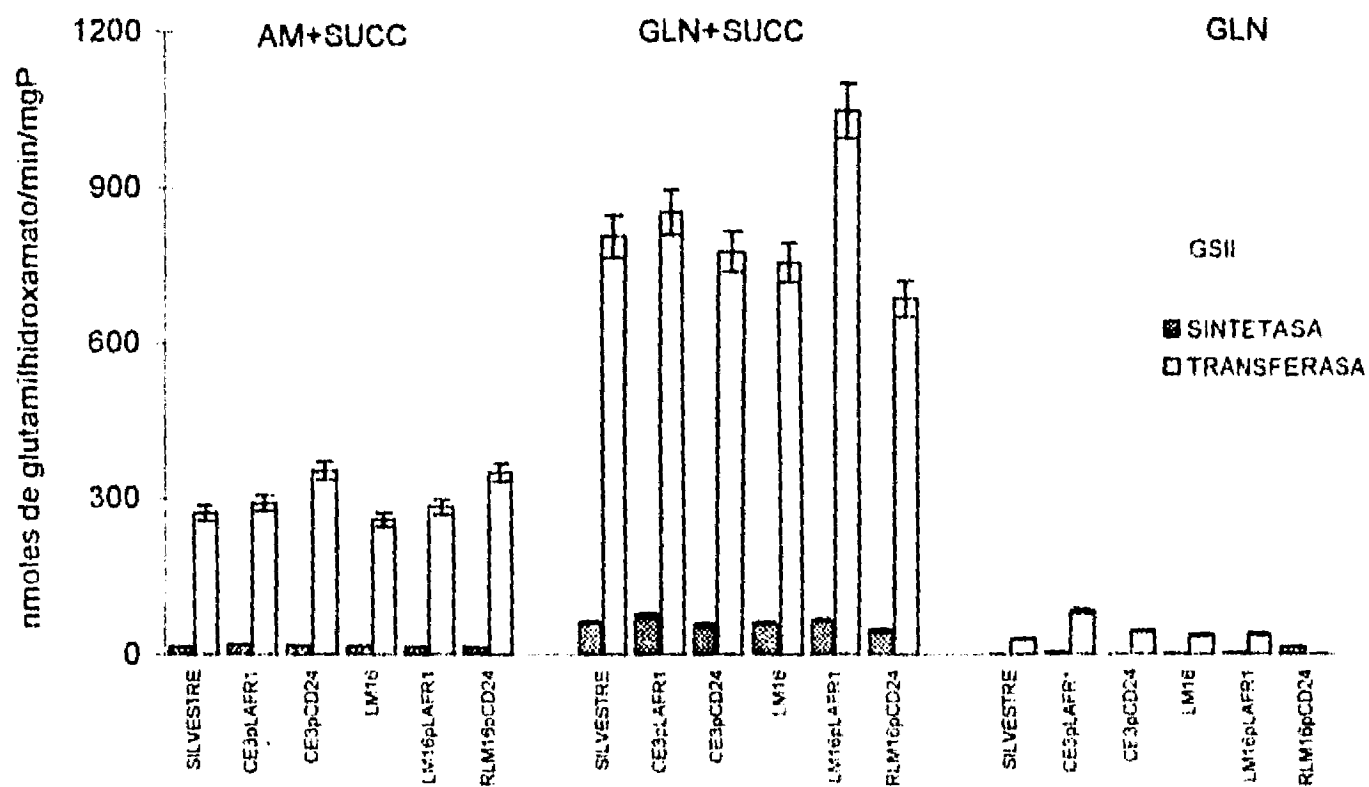


Fig. 7. Actividad de la glutamino sintetasa II en la cepa silvestre de *R. etli*, en la cepa LM16 y en las cepas con el plásmido pCD24.

En la figura 8 se muestra la actividad de la GOGAT en la cepa LM16 y en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24. Los resultados muestran que en la cepa LM16, esta actividad se encuentra ligeramente elevada en glutamina como fuente de carbono y de nitrógeno comparada con la cepa silvestre. Esto sugiere que la baja actividad de la glutaminasa se compensa por la actividad de la GOGAT, sin embargo,

esta compensación sólo es parcial, debido a la alta poza de glutamina presente en la cepa LM16 en esta condición.

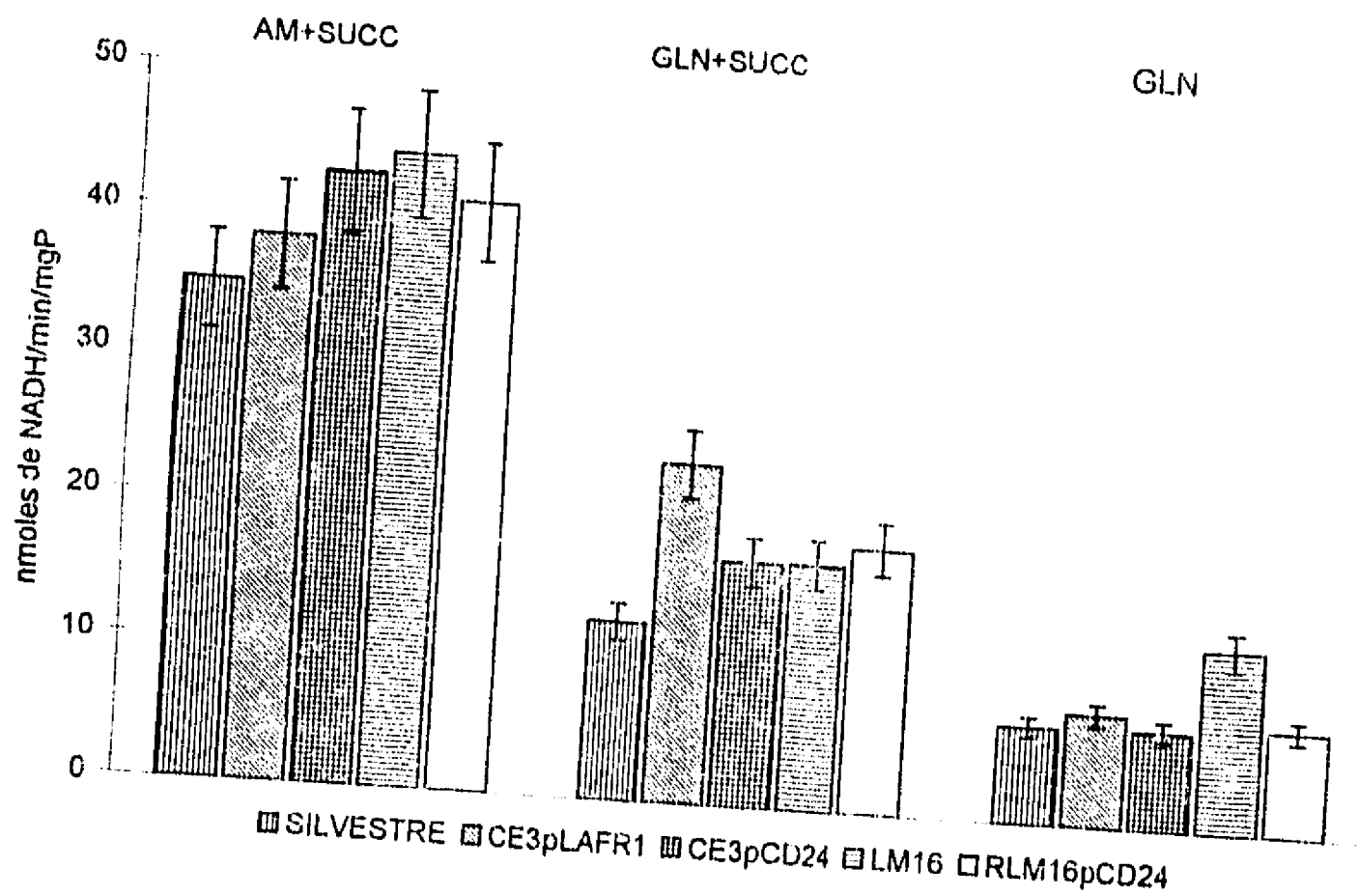


Fig. 8. Actividad de la glutamato sintasa en la cepa silvestre de *R. etli*, en la cepa LM16 y en las cepas con el plásmido pCD24.

El hecho de que la cepa LM16 presente actividad baja de glutaminasa podría deberse a la presencia de otra glutaminasa o que la mutación sea regulatoria. Trabajos recientes realizados en el laboratorio sugieren fuertemente que esta actividad

corresponde a otra glutaminasa. Es decir, *R. elli* presenta dos actividades de glutaminasas que se distinguen por su termoestabilidad y movilidad electroforética (69).

Para estudiar la termoestabilidad de las dos isoenzimas de la glutaminasa en *R. elli*, los extractos celulares de la cepa silvestre y de la cepa LM16 se calentaron a intervalos de 2, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos a 50°C. Los resultados muestran que en la cepa silvestre, la actividad de la glutaminasa se inactiva un 90% a los 15 minutos quedando una actividad residual. La actividad de la glutaminasa presente en la cepa LM16 sólo se inactiva en un 15% a los 15 minutos. Estos resultados indican que en la cepa silvestre la glutaminasa termolábil se inactiva totalmente a los 15 minutos y que la cepa LM16 sólo presenta actividad de glutaminasa termoestable (69).

Se determinó la estabilidad de la glutaminasa en extractos celulares de *R. elli* y de la cepa LM16 sin calentar y calentados a 50 °C durante 15 minutos (Fig. 9). Los resultados muestran que en la cepa silvestre, al calentar los extractos, se pierde la actividad observada en los extractos sin calentar, quedando una actividad residual en todas las condiciones. También puede observarse que en la cepa LM16, los extractos sin calentar y calentados, presentan similar actividad de glutaminasa. Esta actividad es similar a la actividad residual que presenta la cepa silvestre después de calentar los extractos celulares a 50 °C.

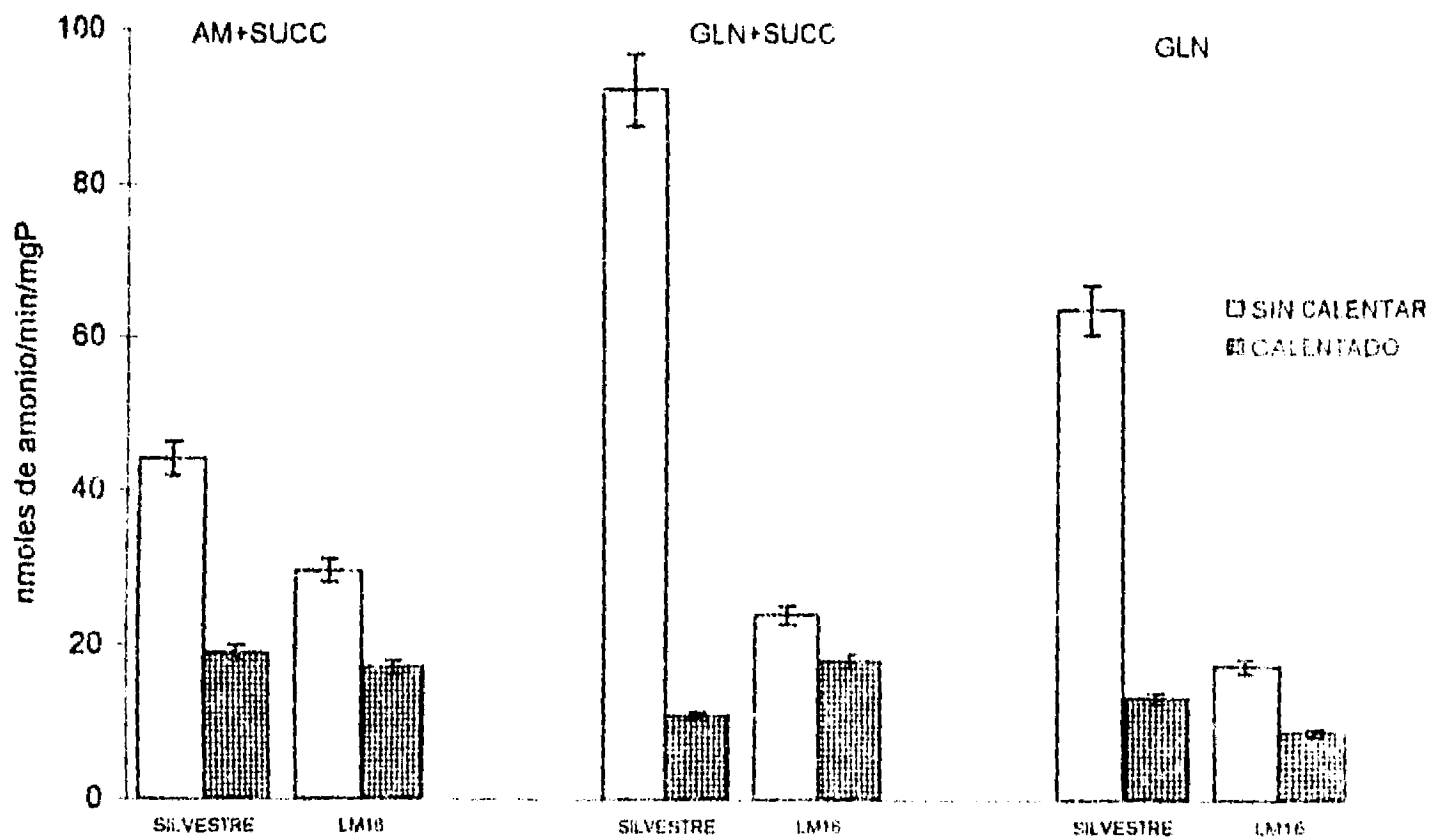


Fig. 9. Actividad de la glutaminasa termolábil en *R. etli* y en la cepa LM16.

Estos resultados indican que la cepa silvestre de *R. etli*, presenta dos actividades de glutaminasas. Una glutaminasa termolábil y otra termoestable a 50 °C. También indican que la cepa LM16 está alterada en la glutaminasa termolábil y sólo presenta actividad de glutaminasa termoestable, esta isoenzima es constitutiva.

También se determinó la estabilidad de la glutaminasa en extractos celulares de las cepas con el plásmido pCD24, sin calentar y calentados a 50 °C durante 15 minutos. Los extractos celulares se obtuvieron de medio mínimo suplementado con glutamina

más succinato (Fig. 10). Los resultados muestran que en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 la actividad de la glutaminasa se inactivó cuando los extractos se calentaron a 50 °C, de manera similar como se inactiva la glutaminasa termolábil en la cepa silvestre, quedando una actividad residual similar a la actividad de la cepa LM16. Estos resultados indican que el gene clonado corresponde a la glutaminasa termolábil.

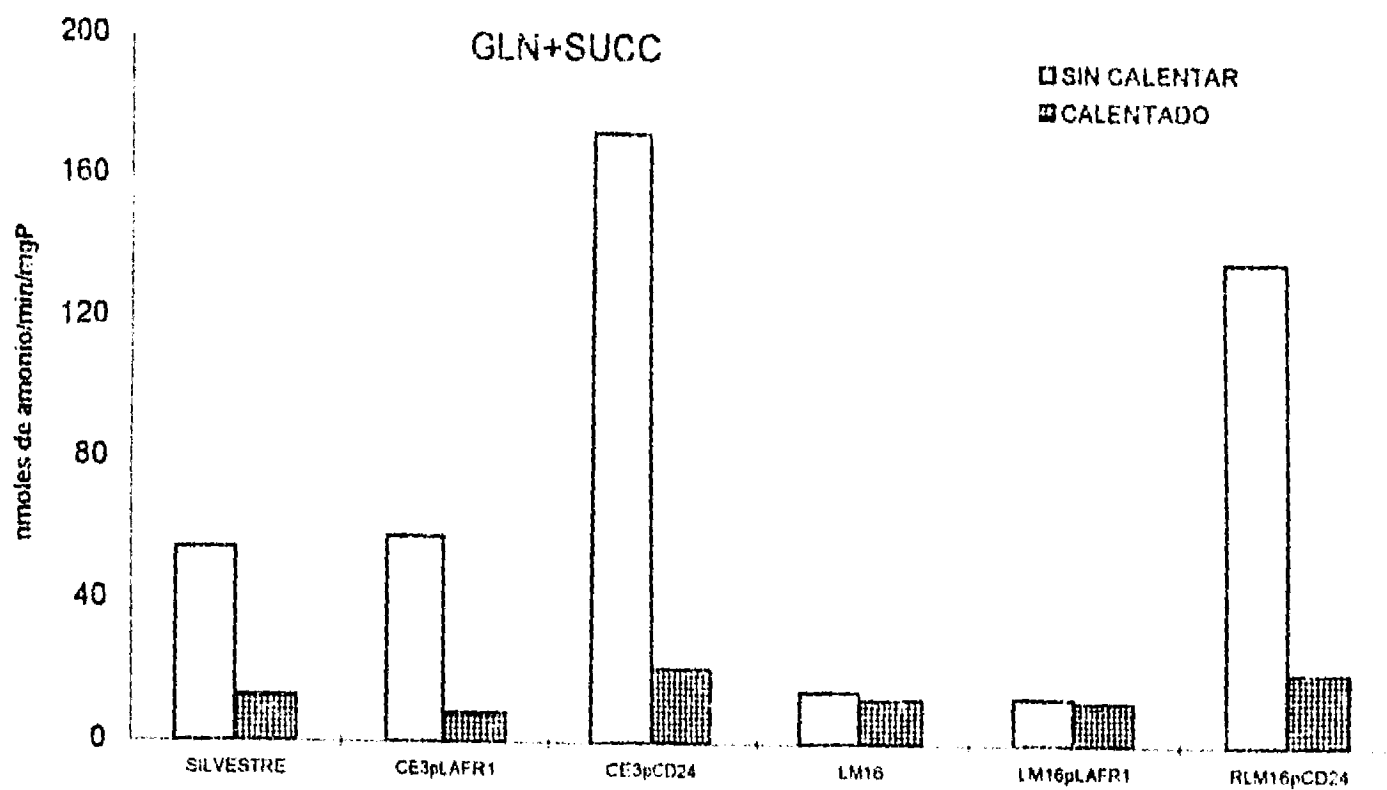
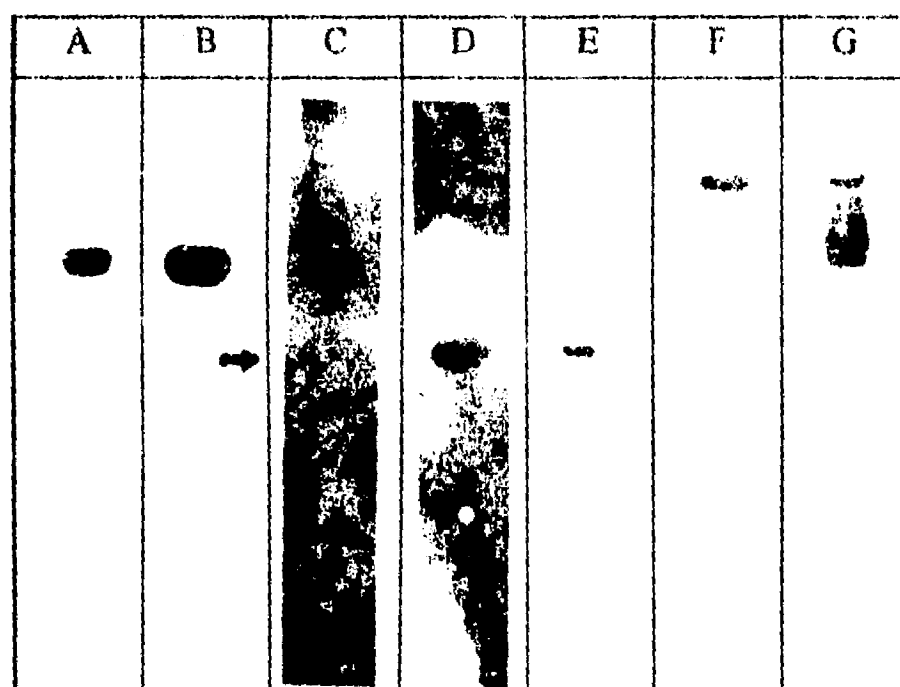


Fig. 10. Actividad de la glutaminasa en *R. etli*, en la cepa LM16 y en las cepas con el plásmido pCD24.

Para diferenciar las isoenzimas de la glutaminasa en *R. etli*, por su movilidad electroforética, se determinó la actividad de glutaminasa *in situ* en un gel nativo de poliacrilamida.



A) Extracto de la cepa silvestre de *R. etli* B) CE3/pCD24 C) Extracto parcialmente purificado de la cepa silvestre de *R. etli* D) Extracto parcialmente purificado de la cepa LM16 E) LM16/pCD24 F) Extracto de la cepa silvestre de *R. meliloti* G) Rm/pCD24

Fig. 11. Actividad de la glutaminasa *in situ* en gel nativo de poliacrilamida de la cepa silvestre de *R. etli*, la cepa LM16 y las cepas con el plásmido pCD24.

Los resultados de la figura 11 muestran que en los extractos crudos de la cepa silvestre de *R. etli*, sólo se identificó una banda de actividad (carril A), en la transconjugante CF3/pCD24, también se identificó una banda que migra de manera similar, pero ésta es más intensa (carril B).

Los extractos de la cepa silvestre de *R. etli* y de la cepa LM16 se purificaron parcialmente para determinar la actividad de la glutaminasa. Los resultados muestran que en la cepa silvestre se identificaron dos bandas. Una banda que migra de manera similar a la observada en los extractos crudos y otra que migra más pero de menor intensidad (carril C). En la cepa LM16 sólo se identificó una banda de actividad que migra de manera similar a la banda de menor intensidad identificada en la cepa silvestre (carril D).

En los extractos de la transconjugante RLM16/pCD24, se identificó una banda de actividad que migra de manera similar a la banda de menor migración en la cepa silvestre de *R. etli* (carril E).

También se determinó la actividad de glutaminasa en la cepa silvestre de *R. meliloti* y en la cepa de *R. meliloti* con el plásmido pCD24 (Rm/pCD24). Los resultados muestran que en los extractos de la cepa silvestre de *R. meliloti* se identificó una banda de actividad que migra diferente a las bandas observadas en la cepa silvestre de *R. etli* (carril F). La cepa Rm/pCD24 presenta, una banda que migra de manera similar a la banda de la cepa silvestre de *R. meliloti*. Otra que migra de manera similar a la banda de menor migración en *R. etli* y además presenta varias bandas intermedias (carril G). El hecho de haber observado

una banda de actividad en la cepa Rm/pCD24 que migra diferente a la banda de la cepa silvestre de *R. meliloti* sugiere fuertemente que el plásmido pCD24 contiene el gene estructural de la glutaminasa de *R. etli*.

DISCUSION

Hemos encontrado que la actividad de la glutaminasa en *R. etli* se encuentra alta durante la fase exponencial de crecimiento comparada con la GOGAT o con la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa, independientemente de la fuente de nitrógeno o carbono (Fig. 1a). La actividad de la glutaminasa se induce por glutamina, se reprime por amonio y por succinato o glicerol (Fig. 2a) y se encuentra alta en bacteroides de *R. etli* en comparación con la GOGAT o la vía de transaminasa de glutamina- ω -amidasa (69).

Se propusó que la glutaminasa juega un papel importante en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono cuando utiliza este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno y en mantener el balance óptimo de las pozas de la glutamina y el glutamato (69).

Para conocer el papel de la glutaminasa en *R. etli*, se aisló y caracterizó una cepa de *R. etli* (LM16) alterada en la actividad de la glutaminasa.

La cepa LM16 fue seleccionada por su incapacidad de crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y por su capacidad de crecer en glutamina más succinato o en otras fuentes de nitrógeno y carbono. El hecho de que la cepa esté afectada únicamente

NOTA: Las figuras con la letra a corresponden al 1^{er} artículo, con la letra b al 2^{do} artículo y con la letra c a los resultados adicionales.

La baja actividad de glutaminasa en la cepa LM16 en diversas condiciones (70), así como el hecho de que esta cepa no crezca en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 1b), sugieren que el principal papel de la glutaminasa es la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono cuando este aminoácido es utilizado como fuente de carbono.

Para evaluar la participación de la glutaminasa en mantener el balance entre la glutamina y el glutamato, se determinaron las pozas de estos aminoácidos en la cepa LM16 (Tabla 1b). La cepa LM16 acumula 53 veces más glutamina y 3 veces menos glutamato en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno en comparación con la cepa silvestre. En las otras condiciones puede observarse el mismo comportamiento en diferente proporción. Estos resultados indican que la glutamina es transportada y que la glutaminasa sí tiene un papel en mantener el balance entre la glutamina y el glutamato.

Cuando *R. etli* crece en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato o sin succinato, excreta amonio al medio (69). Para evaluar la participación de la glutaminasa en la excreción de amonio, se determinó la excreción en la cepa LM16 (Fig. 2b). La cepa LM16 excreta 7 veces menos amonio en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y excreta 2 veces menos amonio que la cepa silvestre en glutamina más succinato a las 24 hrs. Estos resultados indican la participación de la glutaminasa en la degradación de la glutamina a amonio y también la participación de otras vías como por ejemplo la transaminasa de glutamina- ω -amidasa.

Para evaluar la participación de la glutaminasa en la utilización de la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, se determinó la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[U- ^{14}C]glutamina en la cepa LM16 y en la cepa silvestre (Fig. 3b). El hecho de que la cepa LM16 presente baja evolución de $^{14}\text{CO}_2$ únicamente en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno comparada con la cepa silvestre, indica que el principal papel de la glutaminasa es utilizar a la glutamina como fuente de carbono y de nitrógeno. También indica la participación de otras vías en la degradación de la glutamina a CO_2 .

El hecho de que la cepa LM16 tenga poza alta de glutamina y baja de glutamato cuando crece en medio mínimo suplementado con amonio más succinato (tabla 1b), indica que la glutaminasa tiene un papel en mantener el balance entre la glutamina y el glutamato y sugieren que bajo estas condiciones la glutaminasa participa en un ciclo donde la glutamina es degradada y resintetizada por la GS (69).

La poza alta de glutamina y la poza baja de glutamato encontradas en bacteroides de la cepa LM16 indican la participación de la glutaminasa en la degradación de la glutamina en *R. etli* durante la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. El hecho de que la baja actividad de la glutaminasa en la cepa LM16 no se refleje en la actividad de la nitrogenasa, ni en la nodulación (70), puede explicarse por la participación de otras vías en la degradación de la glutamina, como la GOGAT encontrada en bacteroides de *R. etli* (69) o también podría deberse a la participación de otra glutaminasa.

En este trabajo también se describe la clonación de una región del cromosoma de *R. elli* (en el plásmido pCD24) que complementa la mutación de la cepa LM16. Las transconjugantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en glutamina como fuente de carbono y de nitrógeno. Las cepas con el plásmido pCD24 presentan más actividad de glutaminasa que la cepa silvestre, lo que indica que este plásmido contiene el gene que codifica para la glutaminasa (Fig. 2c). El hecho de haber encontrado en la cepa de *R. meliloti* con el plásmido pCD24 (Rm/pCD24) mayor actividad de glutaminasa que en la cepa silvestre de *R. meliloti* sugiere fuertemente que este plásmido contiene el gene estructural de la glutaminasa (Fig. 3c).

La actividad de glutaminasa en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16pCD24 es mayor y se regula de manera similar (Fig. 4c). Estos resultados indican que a pesar de sobreexpresada la actividad de la glutaminasa, esta enzima se regula positivamente por glutamina y negativamente por amonio y por la fuente de carbono como en la cepa silvestre.

Las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 también crecen de manera similar a la cepa silvestre, en los diferentes medios probados (Fig. 5c). En un medio mínimo suplementado con amonio más succinato, se pensó que una alta actividad de glutaminasa podría disminuir el crecimiento de *R. elli*, debido a que la glutamina podría estar degradándose y sintetizándose a una mayor velocidad que en la cepa silvestre. El hecho de que las cepas con el plásmido pCD24 crezcan de manera similar a la cepa silvestre sin el

plásmido en amonio más succinato sugiere que la sobreexpresión de la glutaminasa es compensada por una mayor síntesis de la glutamina o que esta enzima está regulada alostéricamente.

Cuando *R. etli* crece en un medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de carbono y nitrógeno su tiempo de duplicación es menor que cuando crece en glutamina más succinato. Se pensó que *R. etli* con una alta actividad de glutaminasa, podría crecer de manera similar que en glutamina más succinato debido a un aumento en la degradación de la glutamina y utilizarla en la síntesis de proteína. El hecho de que las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 crezcan de manera similar a la cepa silvestre, en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 5c), indica que la actividad de esta enzima no es la que limita el crecimiento en *R. etli* en esta condición.

Para evaluar el efecto de la disminución de la actividad de la glutaminasa, sobre la síntesis de la glutamina, se determinaron las actividades de las GSs I y II en la cepa LM16 (Figs. 6c y 7c). El hecho de que en la cepa LM16 las actividades de las GSs I y II sean similares a la cepa silvestre, puede ser explicado por la participación de otras enzimas en la degradación de la glutamina, como la GOGAT o la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa que podrían compensar la baja actividad de la glutaminasa en la cepa LM16, como lo indican los resultados de la figura 3b en donde la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[U- ^{14}C] glutamina en medios mínimos suplementados amonio más succinato en la cepa LM16, es similar a la cepa silvestre.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de la actividad de la glutaminasa, sobre la síntesis de la glutamina, se determinaron las actividades de las GSs I y II en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 (Figs. 6c y 7c). El hecho de que en las cepas con el plásmido pCD24 las actividades de las GSs I y II sean similares a la cepa silvestre de *R. etli* sugiere que posiblemente las GSs I y II o la glutaminasa podrían estar reguladas alostéricamente de tal manera que los niveles de actividad de estas enzimas *in vitro* no corresponden a su actividad *in vivo*.

Para evaluar el efecto de la disminución y de la sobreexpresión de la actividad de glutaminasa, en la asimilación de la glutamina, se determinó la actividad de la GOGAT en la cepa LM16 y en las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 (Fig. 8c). La actividad de la GOGAT solo se eleva en la cepa LM16 en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, probablemente porque la poza de glutamato es baja en esta condición, se sabe que este aminoácido reprime la actividad de GOGAT en *R. etli* (17), sin embargo la compensación de esta enzima sólo es parcial, debido a la alta poza de glutamina presente en la cepa LM16, dicha compensación no le permite a la cepa LM16 crecer en esta condición.

Estudios realizados en el laboratorio sugieren fuertemente la presencia de dos isoenzimas de la glutaminasa en *R. etli*, dichas actividades se distinguen por su termoestabilidad y por su movilidad electroforética (71).

Cuando los extractos de *R. etli* son calentados a 50 °C durante 15 minutos, la actividad de glutaminasa se inactiva en un 90% quedando una actividad residual. Estos resultados indican que la glutaminasa termolábil se inactiva a los 15 minutos y que la actividad residual corresponde a la glutaminasa termoestable.

Cuando los extractos de la cepa LM16 son calentados a 50 °C durante 15 minutos, la actividad de la glutaminasa sólo se inactiva el 15%. Estos resultados indican que la cepa LM16 sólo presenta actividad de glutaminasa termoestable.

Estos resultados sugieren fuertemente que *R. etli* tiene dos actividades de glutaminasa , una termolábil y otra termoestable a 50 °C y que al inactivar totalmente la glutaminasa termolábil a los 15 minutos en la cepa silvestre de *R. etli*, también se inactiva el 15% de la actividad termoestable en la cepa LM16 (71).

Para evaluar la estabilidad de las isoenzimas de la glutaminasa en *R. etli*, se determinó la actividad de esta enzima en extractos celulares de *R. etli* y de la cepa LM16 sin calentar y calentados a 50 °C (Fig. 9c). Los resultados muestran que la glutaminasa termolábil es la enzima que se regula positivamente por glutamina y negativamente por amonio y la fuente de carbono (Fig. 2a). Por lo tanto la glutaminasa termolábil es la que tiene un papel fundamental en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono cuando utiliza este aminoácido como fuente de carbono y nitrógeno y en mantener el balance óptimo de las pozas de la glutamina y el glutamato. También se encontró una actividad residual que es constitutiva y es similar a la actividad en la cepa LM16.

El hecho de haber encontrado actividad similar de glutaminasa en los extractos sin calentar y calentados en la cepa LM16, indica que la actividad de la glutaminasa en esta cepa corresponde a la glutaminasa termoestable y que esta enzima es constitutiva. También indican que la cepa LM16 está alterada en la glutaminasa termolábil. La diferencia que se observa en los extractos sin calentar y calentados en la cepa LM16 puede explicarse debido a que esta actividad se inactiva en un 15% al calentar los extractos a 50 °C.

Para analizar si el gene clonado pertenece a la glutaminasa termolábil o a la glutaminasa termoestable, se determinó la actividad de la glutaminasa en los extractos de las transconjugantes CE3/pCD24 y RLM16/pCD24 sin calentar y calentados a 50 °C (Fig. 10c). El hecho de que se inactive la actividad de la glutaminasa en las cepas con el plásmido pCD24 al calentar los extractos, indica que el gene clonado codifica para la glutaminasa termolábil.

Al analizar las isoenzimas de la glutaminasa en *R. etli*, por su movilidad electroforética, los extractos de la cepa silvestre y la cepa LM16 tuvieron que purificarse parcialmente, debido a que en los extractos crudos al determinar la actividad de la glutaminasa, interfieren otras reacciones como oxidasas o deshidrogenasas (72).

El hecho de haber identificado dos bandas en los extractos parcialmente purificados de *R. etli* (Fig. 11, carril C) y una banda en la cepa LM16 (carril D) indican fuertemente la presencia de dos actividades de glutaminasas en *R. etli* y que la cepa LM16 está alterada en una de las actividades de glutaminasas. Correlacionando estos resultados con los resultados

de termoestabilidad, se sugiere que la banda que migra menos en la cepa silvestre de *R. etli*, corresponde a la glutaminasa termolábil y la banda de menor intensidad que migra de manera similar a la banda de actividad en la cepa LM16 corresponde a la glutaminasa termoestable.

En los extractos de la transconjugante CE3/pCD24 (carril B), se identificó una banda que migra de manera similar, pero de mayor intensidad, a la banda de menor migración de *R. etli* (carril C). Estos resultados indican que el plásmido pCD24 contiene el gene que codifica para la glutaminasa termolábil. La mayor intensidad que se observa en esta banda se debe a la sobreexpresión de la actividad de glutaminasa.

En los extractos de la transconjugante LM16/pCD24 (carril E), se identificó sólo una banda de actividad que migra de manera similar a la banda de menor migración en la cepa silvestre de *R. etli* (carril C). Estos resultados confirman que el plásmido pCD24 contiene el gene que codifica para la glutaminasa termolábil. El hecho de no observar la banda que corresponde a la glutaminasa termoestable es debido a la interferencia de otras reacciones como oxidasa o deshidrogenasas en los extractos crudos (72).

En los extractos de la cepa silvestre de *R. meliloti* (carril F), se identificó una banda de actividad que migra diferente a las bandas de *R. etli*. En los extractos de la transconjugante Rm/pCD24 (carril G), se identificaron varias bandas de actividad. Una banda que migra similar a la banda de menor migración en *R. etli* (carril C), otra banda que migra similar a la banda de la cepa silvestre de *R. meliloti* (carril F) y varias bandas

intermedias. El hecho de que la transconjugante Rm/pCD24 se exprese la actividad de la glutaminasa sugiere fuertemente que el plásmido pCD24 contiene el gene estructural de la glutaminasa de *R. etli*. Y también sugiere que este gene codifica para la glutaminasa termolábil, debido a que una de las bandas migra de manera similar a la banda de actividad que corresponde a la glutaminasa termolábil en *R. etli*.

Las diferentes bandas intermedias que se observan en la transconjugante Rm/pCD24 (carril G) sugieren la formación de oligómeros híbridos entre los monómeros de las glutaminasas de *R. etli* y de *R. meliloti*.

El hecho de haber encontrado en *R. etli* dos bandas de actividad en el gel de poliacrilamida y una banda en la cepa LM16, sugiere fuertemente la presencia de dos isoenzimas de la glutaminasa que se distinguen por su termoestabilidad. En otros microorganismos como *E. coli* se ha reportado que tiene dos isoenzimas de la glutaminasa que se distinguen por su pH óptimo (62,63), *S. cerevisiae* que tiene dos isoenzimas que se distinguen por su localización, termoestabilidad, su sensibilidad a piruvato y 2-oxoglutarato y por su pH óptimo (64), *B. licheniformis* en donde se sugieren dos isoenzimas que se distinguen por su pH óptimo (65) y también hay dos glutaminasas en mamíferos (68).

CONCLUSIONES

- A). Se obtuvo una cepa de *R. etli* (LM16) alterada en la actividad de glutaminasa con un ligero crecimiento en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.
- B). La caracterización de la cepa LM16 indica que en *R. etli* la glutaminasa tiene un papel fundamental en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono.
- C). La glutaminasa de *R. etli* también tiene un papel en mantener un balance óptimo entre las pozas de glutamina y de glutamato.
- D). La cepa LM16 está alterada en la actividad de la glutaminasa termolábil.
- E). La actividad residual de la glutaminasa en la cepa LM16 corresponde a la glutaminasa termoestable.
- F). El plásmido pCD24 contiene el gene que codifica para la glutaminasa termolábil .

PERSPECTIVAS

Para conocer la función y regulación de las isoenzimas de la glutaminasa en *R. etli*, es necesario: primero obtener una doble cepa en la actividad de la glutaminasa, así como una cepa en la actividad de la glutaminasa termoestable. La caracterización de estas mutantes nos permitirá conocer la función de las glutaminasas en *R. etli*, además nos permitirá conocer si la síntesis y degradación de la glutamina en *R. etli* se altera sin la participación de la glutaminasa en la degradación de la glutamina.

Para conocer el nivel de regulación de la glutaminasa es necesario clonar el gene de la glutaminasa termoestable. Subclonar los genes que codifican para la glutaminasa. Con los genes clonados se podran medir los niveles de RNAm y se podría secuenciar estos genes. La secuencia de DNA nos permitirá conocer por ejemplo si en la región regulatoria existe un sitio de unión a CAP o bién conocer el tipo de promotor. Las secuencias de DNA de las glutaminasas podrían compararse con las secuencias de genes estructurales de otras glutaminas para confirmar si los genes clonados corresponden a los genes estructurales que codifican para la glutaminasa en *R. etli*.

Para evaluar si la glutaminasa se regula alostéricamente es necesario purificar la glutaminasa para determinar sus constantes cinéticas y sus posibles reguladores alostéricos.

Estos estudios nos permitirán conocer porqué participan dos glutaminasas en la degradación de la glutamina en *R. etli*, además de la glutamato sintasa y de la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa.

Por ultimo sería muy importante la obtención de una mutante afectada en el transporte de la glutamina, esta mutante nos permitiría conocer si la glutamina es sintetizada por la glutamino sintetasa en el bacteroide o si es proporcionada por la planta. En los bacteroides de *R. elli* la actividad de la glutaminasa se encuentra alta mientras que la la glutamino sintetasa se encuentra baja.

BIBLIOGRAFIA

1. Stadtman, R. 1973. A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. Prusiner, S., and E. Stadman Eds. The enzymes of glutamine metabolism. Prusiner, S., De. Academic Press Inc. p. 1.
2. Vaca, G., and J. Mora. 1977. Nitrogen regulation of arginase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 131: 719.
3. Marzluf, G. A. 1991. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45: 437.
4. Mora, J., Calderón, J., and G. Hernández. 1988. Search, assimilation, and turnover of nitrogen in some fungi, S. Sánchez-Esquivel. Ed. Nitrogen Source Control of Microbial Processes, CRC Press Inc. p. 59.
5. Mora, J. 1990. Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. Microbiol. Rev. 54: 293.
6. Calderón, J., and J. Mora. 1985. Glutamine cycling in *N. crassa*. J. Gen. Microbiol. 131: 3237.
7. Flores, B., and A. González. 1992. Glutamine biosynthesis and catabolismo: A mechanism to coordinate ammonium and carbon metabolism in *S. cerevisiae*. VII PAABS Congress, XIX Congress of the Mexican Biochemical Society. p.56
8. Flores-Samaniego, B, Olivera, H. and A. González. 1993. Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 175, 23: 7705.
9. Ginsburg, A. and R. Stadtman. 1973. Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Prusiner, S., and E. Stadman Eds. The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press Inc. p. 9.
10. Halpern, Y. 1988. Control of glutamine biosynthesis. Sánchez-Esquivel, S. En Nitrogen source control of microbial processes. CRC. Press, Inc. p. 25.
11. Adler, S., Purich, D. and E. Stadtman. 1975. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the P_{II} regulatory protein and the uridylytransferase-uridylyl-removing enzyme. J. Biol. Chem. 250: 6264.

12. Reitzer, L. and B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schacter and H.E. Umbarger, Eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. vol. 1 p.302.
13. Darrow, R. and R. Knotts. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 554.
14. Fuchs, R. and D. Keister. 1980. Identifications of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 141: 996.
15. Kumar, P. and S. Rao. 1986. Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to *Rhizobia*. *Curr. Microbiol.* 14: 221.
16. Donald, R. and R. Ludwig. 1984. *Rhizobium sp* strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 158: 1144.
17. Bravo, A. and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170: 980.
18. Rossi, M., Defez, R., Chiurazzi, M., Lamberti, A., Fuggi, A. and M. Iaccarino. 1989. Regulation of glutamine isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *vicinae*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 629.
19. Somerville, J. and M. Kahn. 1983. Cloning of the glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 156: 168
20. Carlson, T., Guerinot, M. and B. Chelm. 1985. Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 162: 698.
21. Filser, M., Moscatelli, C., Lamberti, A., Vincze, E., Guida, M., Salzano, G. and M. Iaccarino. 1986. Characterization and cloning of two *Rhizobium leguminosarum* genes encoding for glutamine synthetase activities. *J. Gen. Microbiol.* 132: 996.
22. Moreno, S., Meza, R., Guzman, J., Caravez, A. and G. Espín. 1991. The *glnA* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and its role in symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 619

23. Colonna-Romano, S., Riccio, A., Guida, M., Defez, R., Lamberti, A., Iaccarino, M., Arnold, W., Priefer, U. and A. Pühler. 1987. Tight linkage of *glnA* and a putative regulatory gene in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res.* 15: 1951.
24. Reitzer, L. and B. Magazanik. 1986. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45: 785.
25. Carlson, T. and B. Chelm. 1986. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature (London)*. 322: 568.
26. de Bruijn, F., Rossbach, S., Scheider, M., Ratet, P., Mesmer, S., Szeto, W., Ausbel, F. and J. Schell. 1989. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 1673.
27. Shatters, R., Somerville, J. and M. Kahn. 1989. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J. Bacteriol.* 171: 5087.
28. Carlson, T.A. and B.K. Chelm. 1985. Characterization of the gene encoding glutamine synthetase II (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 162: 698.
29. Patriarca, E., Chiurazzi, M., Manco, G., Riccio, A., Lamberti, A., De Paolis, A., Rossi, M., Defez, R., and M. Iaccarino. 1992. Activation of *Rhizobium leguminosarum glnII* gene by NtrC is dependent on upstream DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* 234: 337.
30. Chiurazzi, M., Meza, R., Lara, M., Laha, A., Defez, R., Iaccarino, M., and G. Espín. 1992. The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene* 119: 1.
31. Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R. and M. Iaccarino. 1990. A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* 223: 513.
32. Meza R. 1992. Estudios genéticos y bioquímicos de la GSIII de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM.
33. Powers, S.G., and A. Meister. 1978. Mechanism of the reaction catalyzed by carbamyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 253: 800.

34. Trotta, P.P., Pinkus, L.M., Wellner, V.P., Estis, L., Hanschemeyer, R.H., and A. Meister. 1973. Structure-function relationships in glutamine-dependent carbamyl phosphate synthase. Prusiner, S., and E. Stadman Ed. The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press Inc. p. 431.
35. Tempest, D.W., Meers, J.L. and C.M. Brown. 1973. Glutamate synthase (GOGAT): a key enzyme in the assimilation of ammonio by prokaryotic organisms. Prusiner, S., and E. Stadman Ed. The enzymes of glutamine metabolism. Prusiner, S. Ed. Academic Press Inc. p. 167.
36. Roon, R.J., Eve, H.L., and F. Larimore. 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine nucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 118: 89.
37. Tempest, D.W., Meers, J., and C. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter* by a hitherto unknown route. J. Biochem. 117: 407.
38. Gregerson, R., Miller, S., Twary, S., Gantt, S. and C. Vance. 1993. Molecular characterization of NADH-Dependent glutamate synthase from Alfalfa nodules. Plant Cell. 5: 215.
39. Brenchley, J., Prival, M. and B. Magasanik. 1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. J. Biol. Chem. 248, 17: 6122.
40. Brenchley, J., Baker, C. and L. Patil. 1975. Regulation of ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 124: 182.
41. Miller, R. and E. Stadtman. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*: an iron-sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. 247: 7407.
42. Castaño, I., Bastarrachea, F. and A. Covarrubias. 1988. *gltBDF* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 2: 821.
43. Bohannon, D., Rosenkrantz, M. and A. Sonenshein. 1985. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. J. Bacteriol. 163, 3: 957.
44. Kondorosi, A., Sváb, G. and R. Dixon. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. Molec. Gen. Genet. 151: 221.
45. Lewis, T., González, R. and J. Botsford. 1990. *Rhizobium meliloti* glutamate synthase: cloning and initial characterization of the *glt* locus. J. Bacteriol. 172, 5: 2413.

46. Hilgert, U., Schell, J. and F. de Bruijn. 1987. Isolation and characterization of Tn5-induced NADPH-glutamate synthase (GOGAT) mutants of *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 and cloning of the corresponding *glt* locus. *Mol. Gen. Genet.* 210: 195.
47. Bohmer, A., Muller, A., Passarge, M., Liebs, P., Honeck, H., and H.G. Muller. 1989. A Novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. *Eur. J. Biochem.* 182: 327.
48. Pistorius, E.K. and H. Voss 1980. Some properties of a Basic L-amino acid oxidase from *Anacystis Nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 227.
49. Duerre, J., and S. Chakrabarty. 1975. L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*. *J. Bacteriol.* 121: 656.
50. Meister, A., and S. Tice. 1950. Transamination from glutamine to α -Keto acids. *J. Biol. Chem.* 187: 173.
51. Cooper, A., and A. Meister. 1977. The glutamine transaminase- ω -amidase pathway. *Critical Reviews Biochem.* 4: 281.
52. Cooper, A. and A. Meister. 1984. Comparative studies of glutamine transaminase from rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 698: 137.
53. Cooper, A., and A. Meister. 1972. Isolation and properties of highly purified glutamine transaminase. *Biochem.* 11: 661.
54. Cooper, A., and A. Meister. 1974. Isolation and properties of a new glutamine transaminase from rat kidney. *J. Biol. Chem.* 249: 2554.
55. Cooper, A., and M. Gross. The glutamine transaminase- ω -amidase system in rat and human brain. *J. Neurochem.* 28: 771.
56. Cooper, A., and A., Meister. 1977. Glutamine transaminase and ω -amidase species variations in brain activity and effect of portacaval shunting. *J. Neurochem.* 28: 673.
57. Hersh, L. 1971. Rat liver, ω -amidase. Purification and properties. *Biochem.* 10: 2284.
58. Calderón, J., Morett, E. and J. Mora. 1985. The ω -amidase pathway in the degradation of glutamine in *N. crassa*. *J. Bacteriol.* 161: 807.

59. Calderón, J., Cooper, A., Gelbard, A., and J. Mora. 1989. ^{15}N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *N. crassa*. *J. Bacteriol.* 171: 1772.
60. Soberón, M., and A. González. 1987. Glutamine degradation through the ω -amidase pathway in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 9.
61. Soberón, M., Olamendi, J., Rodríguez, L. and A. González. 1989. Role of Glutamine Aminotransferase in Glutamine Catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under Microaerophilic Conditions. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2693.
62. Stadtman, R. 1973. Glutaminases of *Escherichia Coli*: properties, regulation, and evolution. Prusiner, S., and E. Stadtman Eds. *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press Inc. p. 293.
63. Osorio, A., Camarena, L., Salazar, G., Noll-Louzada, M. and F. Bastarrachea. 1993. Nitrogen regulation in a *Escherichia coli* strain with a temperature sensitive glutamyl-tRNA synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 239: 400.
64. Soberón, M., and A. González. 1987. Physiological role of glutaminase activity in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1.
65. William, R., Joshua, H., and R. Bernlohr. 1981. Occurrence of an inducible glutaminase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 148: 365.
66. Kretovich, V., Sidel'nikova, L., Ivanushkin, A., and T. Karyakina. 1985. Localization of aspartase, asparaginase, and glutaminase in intact bacteroids of *Rhizobium lupini*. Plenum Publishing Corporation. p. 362.
67. Kretovich, V., Sidel'nikova, L., Ivanushkin, A., and T. Karyakina. 1982. Glutaminase and asparaginase activities of bacteroids from *Rhizobium lupini*. Plenum Publishing Corporation. p. 616.
68. Smith, E. and M. Watford. 1990. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. *J. Biol. Chem.* 265: 10631.
69. Durán, S. and J. Calderón. 1995. Role of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiol.* 141: 589.
70. Durán, S., Du Pont, G., Huerta-Zepeda and J. calderón. 1995. The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. *Microbiol.* 000-000.

71. Sánchez Linares Luis T. 1995. Obtención y caracterización de revertantes de la mutante LM16 de *Rhizobium etli* alterada en la actividad de la glutaminasa. Tesis de Licenciatura. UNAM.

72. Aledo, J., Gómez-Biedma, S., Segura, J., Molina, M., Núñez de Castro, Y. and J. Márquez. 1993. Native polyacrilamide gel electrophoresis of membrane proteins: Glutaminase detection after in situ specific activity staining. *Electrophoresis*. 14: 88.