

030624
2eje

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales
y de Posgrado del C.C.H.

LA ASIMILACION DE LA GLUTAMINA EN

Rhizobium etli

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica

Presenta la Bióloga

SOCORRO C. DURAN VARGAS

México, D.F.

1994

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 INICIO EN EL
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA MOLECULAR DEL
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

Y SE CONCLUYO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

U.N.A.M.

BAJO LA DIRECCION DEL DR. JORGE F. CALDERON JIMENEZ

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO
FUI APOYADA ECONOMICAMENTE POR EL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
CON UNA BECA DE MAESTRIA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Mora, al Dr. Edmundo Calva
y al Dr. Fernando Bastarrachea
por su participación en mi comite tutorial

A la Dra. Alicia González, a la Dra. Laura Camerena,
al Dr. Edmundo Calva y al Dr. Mario Rocha
por las observaciones realizadas al trabajo

A Aurora Ventura por su asesoria técnica

Al Q.F.B. Alejandra Huerta
por revisar el contenido del trabajo

Dedico este trabajo

Al Dr. Jorge Calderón, al Dr. Sergio Encarnación,
Al Q.I. Luz María Martínez y al I.Q. Leticia Olvera.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	18
METODOLOGIA.....	19
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	45
CONCLUSION.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	58

RESUMEN

La glutamina, uno de los productos primarios de la asimilación de amonio, tiene un papel central en el metabolismo nitrogenado. 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 (2,3). En *Neurospora crassa* se ha estudiado la síntesis y degradación de la glutamina y se propuso que la síntesis de la glutamina y su degradación dan origen a un ciclo, donde este aminoácido es degradado y resintetizado (4). Se sugiere que este ciclo puede contribuir a un gasto energético para una oxidación óptima de esqueletos de carbono en el ciclo de Krebs y puede ser un punto importante de control para coordinar el metabolismo de nitrógeno y carbono (5). El estudio de la asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*, un microorganismo de gran interés biotecnológico para nuestro país, debido a que esta bacteria fija nitrógeno en simbiosis con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol), nos permitirá conocer la degradación de la glutamina en *R. etli* en vida libre y en simbiosis con *P. vulgaris*.

Nosotros hemos encontrado que en *R. etli* la glutamina es degradada por la vía de la transaminasa de glutamina, la -amidasa y por la glutaminasa. Se determinó la actividad de la transaminasa de glutamina, la estequiometría de la reacción, su

especificidad por 2-oxoácidos y su regulación. Se encontró que la transaminasa de glutamina transamina preferentemente con 2-oxoácidos de cadena sencilla, como glioxalato y piruvato, y disminuye su actividad en medio rico. El producto de la transaminasa de glutamina, el 2-oxoglutarato, es hidrolizado por la ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio. Se determinó la actividad de esta enzima y la estequiometría de la reacción.

La glutaminasa es una enzima clave en la degradación de la glutamina, debido a que cuando *R. etli* crece en un medio con glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, este aminoácido es degradado principalmente por esta enzima, dando como productos glutamato y amonio; se determinó la estequiometría de esta reacción y su regulación. La glutaminasa es un enzima que se regula por carbono, glutamina y amonio. En bacteroides de *R. etli* se determinaron las actividades de la transaminasa de glutamina, la ω -amidasa, la glutaminasa y la glutamato sintasa y se encontró que la actividad de la glutaminasa es la más elevada.

Los resultados obtenidos sugieren que la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa tiene un papel importante en la síntesis irreversible de la glicina y alanina y que la glutaminasa tiene un papel fundamental en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono, cuando la bacteria utiliza este aminoácido como fuente de carbono ó en limitación de carbono. La alta actividad de la glutaminasa encontrada en los bacteroides sugiere que la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono puede tener un papel importante durante la simbiosis.

INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento importante para los seres vivos debido a que forma parte de la estructura de ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos indispensables para los procesos vitales de la célula. El nitrógeno existe en diferentes estados de oxidación: nitrato, nitrito, nitrógeno molecular y amonio (6).

Aunque el nitrógeno molecular es abundante en la atmósfera (80% en volumen), es relativamente inerte desde el punto de vista químico y solamente algunos microorganismos pueden reducir el nitrógeno atmosférico, aumentando de esta manera la cantidad de formas nitrogenadas útiles en la biósfera (7).

El nitrógeno sufre un número de transformaciones que involucran a compuestos orgánicos, inorgánicos y volátiles, que constituyen el ciclo del nitrógeno. Este puede iniciar con la mineralización del nitrógeno, en donde parte de la gran reserva de complejos orgánicos en el suelo (humus) es descompuesta y convertida a iones inorgánicos (amonio y nitrato), que son usados por las plantas. El nitrógeno orgánico es mineralizado por organismos heterotróficos, principalmente bacterias amonificantes y hongos de descomposición.

En la amonificación, el amonio es formado a partir de compuestos orgánicos, ya que es el producto final de la excreción animal y casi todo el nitrógeno inorgánico fluye a través de este compuesto. La mayoría de los productos de degradación son reasimilados en los sistemas oceánicos y terrestre. La liberación de amonio puede ocurrir en condiciones aeróbicas y anaeróbicas; la

primera en el suelo y la segunda en sedimentos de océanos y lagos.

La nitrificación consiste en la oxidación del amonio a nitrato, la nitrificación autotrófica es desarrollada por bacterias del tipo gram negativas de la familia *Nitrobacteriaceae*. Los organismos en esta familia son capaces de obtener todos sus requerimientos energéticos, para su crecimiento, de la oxidación de amonio o nitritos.

Las bacterias quimioautotróficas del género *Nitrosomas* son consideradas las bacterias representativas que oxidan amonio a nitrito. La serie subsecuente de reacciones que conducen a nitrato son desarrolladas principalmente en el medio por la bacteria autotrófica *Nitrobacter*.

El nitrógeno, una vez en forma de nitrato, puede perderse del suelo de varias formas. A causa de su solubilidad en la solución del suelo, el nitrato se mueve fácilmente colocándose por debajo de la zona de penetración radicular. El nitrógeno y el amonio serán excluidos para satisfacer la demanda de nutrimentos de la cubierta vegetal y por la desnitrificación, en donde bacterias como *Pseudomonas desnitrificans* convierten el nitrato en monóxido y nitrógeno molecular, que escapan a la atmósfera. Un sexto del total del nitrógeno es perdido por la desnitrificación y es compensado por el nitrógeno atmosférico que es reducido a amonio por bacterias llamadas fijadoras del nitrógeno, completando así el ciclo del nitrógeno (8,9).

La fijación del nitrógeno es un proceso limitante y con alto costo energético, y por lo tanto es escaso en la corteza terrestre.

Una importante cantidad del nitrógeno es fijado por bacterias del género *Rhizobium*, que establecen una relación simbiótica con plantas leguminosas, las plantas proveen de fuente de carbono a las bacterias para realizar esta reacción. Hay también bacterias de vida libre que fijan nitrógeno, como *Azotobacter* y *Klebsiella*; sin embargo, el gasto de energía para su crecimiento reduce la eficiencia de estas bacterias comparada con la fijación de nitrógeno simbiótica y contribuye sólo con un quinto del nitrógeno fijado. Una pequeña contribución de la fijación de nitrógeno es el resultado de procesos abióticos (10,11).

Debido a su escasez, el nitrógeno disponible en el suelo para ser utilizado por las plantas es uno de los factores que limitan la agricultura, es por esto que los suelos deben ser fertilizados constantemente, aumentándose así la demanda en la producción de fertilizantes (12).

El proceso de Haber-Bosh para la producción de fertilizantes requiere un gasto muy grande de energía (altas temperaturas y presiones), es un proceso costoso (transporte, almacenamiento y aplicación) y representa un potencial negativo en la salud humana y del medio ambiente, esto ha dado como consecuencia, que se concentre la atención en el estudio de la fijación biológica de nitrógeno, como una alternativa para el incremento y mejoramiento de la producción agrícola (12).

Actualmente, se pueden distinguir con claridad dos tendencias en el estudio de la fijación biológica del nitrógeno. La primera con enfoque ecológico y biotecnológico de aplicación inmediata, la

cual se basa en el aislamiento de cepas con una gran capacidad competitiva para nodular a la planta huésped y por su efectividad en fijación de nitrógeno. Dentro de esta primera tendencia existen evaluaciones de la inoculación con múltiples cepas, la inoculación de *Rhizobium* con bacterias productoras de antibióticos y la aplicación de flavonoides para aumentar la eficiencia de la nodulación por *Rhizobium*; todos estos trabajos muestran resultados interesantes para el uso potencial de estas metodologías de manejo de los *Rhizobium* en los agroecosistemas específicos (13,14,15). Sin embargo, cabe destacar que estos estudios deben ser evaluados en el campo para generar paquetes tecnológicos de inoculantes rhizobianos.

La segunda tendencia en el estudio de la fijación del nitrógeno, es tener un conocimiento detallado, tanto a nivel genético como bioquímico de los procesos simbióticos (organogénesis de la planta, reconocimiento e intercambio de señales, la regulación de la expresión de genes y funciones metabólicas), que podrían dar la pauta para ampliar el espectro de nodulación y fijación del nitrógeno a plantas de interés agrícola que no pueden llevar a cabo dicho proceso; incluso se ha planteado la posibilidad de manipular los genes responsables de la fijación del nitrógeno e introducirlos a dichos vegetales, que los reconozca como propios y los exprese de una manera adecuada (16,17).

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la reducción de nitrógeno molecular a amonio y se lleva a cabo por microorganismos en vida libre y en simbiosis. Entre las relaciones

simbióticas tenemos la interacción de *Rhizobium* con plantas leguminosas la cual ha sido estudiada extensamente debido a su importancia económica (12,18).

La especificidad de las interrelaciones entre los simbioses *Rhizobium*-leguminosa, implica algunos mecanismos de reconocimiento, uno de los cuales debe ser el intercambio de señales moleculares entre el hospedero y la bacteria (19). El resultado de la interacción entre *Rhizobium*-leguminosa es la formación de estructuras especializadas en fijar y asimilar nitrógeno, las cuales son llamadas nódulos, y es aquí en donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno. La simbiosis es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas. Cada etapa se puede caracterizar por la acción de un grupo específico de genes tanto de la bacteria como de la planta, que actúan bajo la coordinación de señales moleculares que intercambian el hospedero y el microsimbionte (20,21).

Durante esta interacción, es necesario principalmente, la expresión de los genes de nodulación (*nod*), los cuales están involucrados en las primeras etapas de la interacción y morfogénesis del nódulo; de los genes para la síntesis de exopolisacáridos y lipo-polisacáridos (*exo*), y los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) (22,23,24).

Dentro de las Rhizobiaceas se encuentra *Rhizobium etli*, la cual es de gran interés biotecnológico para nuestro país, debido a que esta bacteria fija nitrógeno en simbiosis con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol).

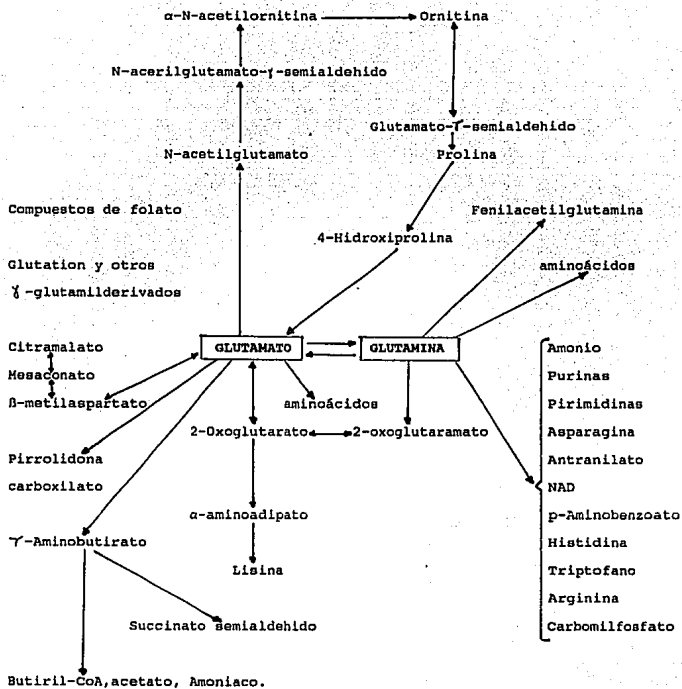
Nosotros estamos interesados en conocer la asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*, debido a que la glutamina es un compuesto clave en el metabolismo del nitrógeno en microorganismos, ya que es utilizada para la síntesis de proteínas, es uno de los donadores universales de nitrógeno (figura 1) y además en algunos microorganismos es considerado el correpresor de la represión catabólica nitrogenada (1,2,3,25,26).

En diversos sistemas celulares, se han encontrado diferentes enzimas capaces de utilizar a la glutamina como sustrato: la transamidasa de glutamina, la glutamato sintasa, la glutaminasa, la oxidasa de L-aminoácidos y la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa.

Las transamidasas 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 átomo amido de la glutamina es usado para la síntesis de los átomos de nitrógeno amido del NAD y de la asparagina, los átomos de nitrógeno 3 y 9 del anillo de purinas, los grupos aminos de la glucosamina, guanina, citosina, ácido p-aminobenzoico, el átomo de nitrógeno del carbamilmfosfato, 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 *Escherichia coli*. Esta enzima tiene un peso de 163 kDa y esta compuesta por dos subunidades, una subunidad pesada de 130 kDa y una subunidad ligera de 40 kDa. La subunidad pesada tiene los

Figura 1



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 transamidasa. Así, parece que el grupo amido de la glutamina se une a un sitio que se encuentra cerca de otro que une amonio (27,28).

La glutamato sintasa 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 (29,30,31). El hecho de que mutantes de *Bacillus subtilis*, que carecían de la actividad de la glutamato deshidrogenasa y de la alanina deshidrogenasa, crezcan en un medio mínimo (32) y de que en *Aerobacter aerogenes* la síntesis de glutamato deshidrogenasa puede estar totalmente reprimida, sin afectar la capacidad de este microorganismo para asimilar amonio llevó a la demostración de que existe otra vía para asimilar amonio (33). En esta vía el amonio es asimilado por la glutamato sintetasa para dar glutamina y después la glutamato sintasa lleva

a cabo la transamidación reductiva de este aminoácido, dando dos moléculas de glutamato.

La participación de la glutamato sintasa en hongos filamentosos se demostró por primera vez en *Neurospora crassa*, con base en la observación de que una cepa mutante que carece de la actividad de glutamato deshidrogenasa crece igual que una cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (34). La glutamato sintasa de *N. crassa* se purificó a homogeneidad. Esta constituida por un sólo tipo de monómeros de peso molecular mayor a 200 kDa. La actividad de la glutamato sintasa en un medio con amonio es baja, comparada con la actividad en un medio limitado de amonio, y se reprime en glutamato (35). La mayor actividad de la glutamato sintasa se encuentra en el medio crecido en limitación de amonio. Esto sugiere que la vía de asimilación que opera en limitación de amonio es la glutamino sintetasa-glutamato sintasa, aunque no se descarta la posibilidad de que la glutamato deshidrogenasa también participe en la asimilación de amonio en esta condición, debido a que se encuentra una apreciable actividad de esta enzima (36).

En *R. etli*, la actividad de la glutamato sintasa requiere como cofactor al NADPH, se reprime por glutamato y se inhibe por ácidos orgánicos. La actividad más alta se encuentra durante la fase exponencial del crecimiento, cuando *R. etli* utiliza amonio como fuente de nitrógeno, o nitrato, o glutamina, y durante la fase estacionaria se mantiene alta y constante. En cambio, cuando utiliza glutamato como fuente de nitrógeno, la actividad de esta enzima es baja. La actividad de la glutamato sintasa se encuentra

cuatro veces más alta cuando *R. etli* utiliza succinato como fuente de carbono comparado cuando utiliza glucosa o fructosa en un extracto sin dializar; en extracto dializado la actividad es similar en estas condiciones, por lo que se propone un efecto inhibitorio de metabolitos (37).

Las glutaminasas son enzimas que catalizan la desaminación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio. Las glutaminasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza: han sido encontradas en mamíferos, plantas, hongos, levaduras y bacterias. 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 (38). *Saccharomyces cerevisiae* también tiene 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 (39). 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 de 9.0 (40). La glutaminasa también ha sido reportada en bacteroides de *Rhizobium lupini* (41,42).

La glutaminasa mejor estudiada es la de mamíferos, en donde se ha reportado la existencia de dos isozimas distintas. La glutaminasa de hígado, encontrada únicamente en hígado de rata adulto, 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 isozimas; también se encontró que difieren marcadamente en tamaño, propiedades físicas, inmunoquímicas y en su regulación. El patrón de similitud entre las dos isozimas sugiere que probablemente son codificadas por genes separados (43).

Las oxidasas de L-aminoácidos catalizan la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos a su correspondiente 2-oxoácido y amonio. En microorganismos se han encontrado diversas oxidasas de L-aminoácidos que son diferentes en su especificidad a L-aminoácidos, han sido agrupadas en: las oxidasas que se caracterizan por su limitada especificidad del 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 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 (44,45).

Proteus rettgeri tiene dos oxidasas de L-aminoácidos. La oxidasa I que utiliza como mejores sustratos a los compuestos aromáticos, monoaminomonocarboxílicos, compuestos con grupo sulfuro, imino y β -hidroxi L-aminoácidos, es termoestable, y tiene un pH óptimo de 7.6. Y la oxidasa II que utiliza como mejores sustratos la L-arginina, L-histidina, L-ornitina, L-lisina y L-

citrulina, tiene alta afinidad por arginina, es termoestable y tiene un pH óptimo de 7.9 (46).

La oxidasa de L-aminoácido de *N. crassa* es capaz de desaminar oxidativamente a la glutamina con una actividad de 50% menor que la que presenta con histidina, que es el mejor sustrato de esta enzima. La síntesis de esta enzima requiere tanto de la inducción, por un aminoácido, como simultáneamente de la derepresión catabólica nitrogenada. La limitación de carbono en presencia de un aminoácido como inductor no permite la inducción de la oxidasa de L-aminoácido. Los inhibidores de la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA bloquean la acumulación de la oxidasa de L-aminoácido, lo que sugiere que la expresión de esta enzima es controlada a nivel de su transcripción (47).

La transaminasa de glutamina cataliza la reacción de la transaminación entre la glutamina y muy diversos 2-oxoácidos. El 2-oxoácido de la glutamina (2-oxoglutarato) es hidrolizado por una ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio. 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. La actividad de la transaminasa de glutamina y de la ω -amidasa ha sido estudiada en tejidos de mamíferos, hongos, bacterias y levaduras (48,49).

La transaminasa de glutamina ha sido estudiada ampliamente en mamíferos, en donde se reportan tres diferentes transaminasas de glutamina que difieren esencialmente en su especificidad por diferentes 2-oxoácidos y su localización intracelular. Una 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 transaminasa de glutamina de riñón (K), presente en citosol, cuyos mejores sustratos son la glutamina, fenilalanina, y los correspondientes 2-oxoácidos. La tercera es la transaminasa de riñón, presente en mitocondria, que difiere de la otra transaminasa de riñón, en ciertas propiedades físicas (50,51,52). La actividad de la ω -amidasa también ha sido encontrada en tejidos de mamíferos (52,53,54).

La vía de la transaminasa de la glutamina y la 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 (55,56,57).

En *S. cerevisiae* también ha sido estudiada la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa. La transaminasa de glutamina fue incrementada en la presencia de glutamina y disminuída 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 (58).

En *Neurospora* y *Saccharomyces* se sugiere que la glutamina puede ser un punto clave para coordinar el metabolismo de carbono y nitrógeno (5,56,59). En algunos microorganismos se ha propuesto a la glutamina como el correpresor del catabolismo nitrogenado (2,3) ya que su concentración determina la utilización del nitrógeno del medio y la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular. De ello depende la regulación de la expresión

genética de un gran número de enzimas del metabolismo nitrogenado, de tal manera que es importante conocer tanto la síntesis de la glutamina como su degradación (60).

En *N. crassa* se ha estudiado la degradación y síntesis de la glutamina, y se propuso que esta degradación y resíntesis dan origen a un ciclo (4), el cual puede contribuir a la formación de aminoácidos por transaminación irreversible. El recambio aminoácidos puede ser una manera de regular rápidamente su concentración intracelular y ésta a su vez, regularía las actividades de la síntesis y la degradación del nitrógeno celular. El ciclaje de la glutamina puede ser también un mecanismo general para tomar o liberar el carbono de los compuestos orgánicos nitrogenados. El ciclaje de la glutamina a glutamato y otros aminoácidos puede ser una manera de mantener el balance de los compuestos nitrogenados. También se demostró que en *N. crassa*, cuando se inhibe el ciclaje de la glutamina a través de inhibir su síntesis, se disminuye el catabolismo de carbono a partir de sacarosa. Se propuso también que el punto de interacción en la regulación coordinada, entre el metabolismo de carbono y nitrógeno, puede ser el gasto de ATP para la síntesis de la glutamina (4,5,56,57).

El estudio de la asimilación de la glutamina en *R. etli*, en vida libre y en simbiosis, nos permitirá conocer la función de la degradación de la glutamina en *R. etli* y su posible papel en coordinar el metabolismo de nitrógeno y carbono, como se ha propuesto en otros microorganismos. También podrá ser evaluada la

importancia de la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono durante la simbiosis, en donde se ha sugerido que los aminoácidos podrían ser utilizados como fuente de carbono y energía en el bacteroide (61,62).

OBJETIVO GENERAL:

Conocer las vías que participan en la asimilación de la glutamina, su regulación y función en *Rhizobium etli* en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*; así como la relación que existe entre la asimilación de la glutamina y la fijación de nitrógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la actividad de enzimas que participan en la asimilación de la glutamina en *R. etli* en vida libre y en simbiosis.
2. Conocer aspectos de la regulación de las enzimas que participan en la asimilación de la glutamina en *R. etli*.
3. Hacer propociones sobre la función de la asimilación de la glutamina en *R. etli* en vida libre y en simbiosis, y sobre la relación que existe entre la asimilación de la glutamina y la fijación de nitrógeno en *R. etli*.

METODOLOGIA

CEPAS.

Se utilizó la cepa silvestre *Rhizobium etli*, resistente a ácido nalidixico y estreptomicina, anteriormente clasificada como *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, cepa CFN42 (63).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Los medios de cultivo se inocularon con la cepa silvestre de *R. etli*, previamente crecida durante 14 hrs en medio rico líquido de PY (extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 0.5%, cloruro de calcio 0.7 M), con una agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm) y a una temperatura de 30 °C. Los medios de cultivo se inocularon a una densidad óptica de 0.05 a 540 nm y se agitaron a 200 rpm a 30 °C. Los medios mínimos (MM) (fosfato de potasio dibásico 1.2 mM, sulfato de magnesio 0.8 mM, cloruro de calcio 150 mM, cloruro de hierro 18 mM) se suplementaron con nitrato de potasio, cloruro de amonio o aminoácidos a una concentración de 10 mM como fuente nitrógeno, y glucosa o succinato a una concentración de 10 mM, o glicerol al 2% como fuente de carbono, como se indica en los pies de figura.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CELULARES.

Los extractos celulares se prepararon a partir de 500 ml de MM suplementados con fuente de nitrógeno y carbono, los cuales se centrifugaron durante 10 minutos a 10 krpm en un rotor JA14. El sobrenadante se decantó, la pastilla de células se resuspendió con

agua y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 10 krpm. La pastilla se resuspendió en 1.5 ml de buffer de extracción (dependiendo de la actividad enzimática que se va a determinar), se rompieron las células en el sonicador (Soniprep 150) durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos en la microfuga y el sobrenadante se dializó en buffer de extracción durante 2 hrs, para la determinación de transaminasa de glutamina y glutamato sintasa y por 24 hrs para la determinación de la ω -amidasa.

Buffers de extracción: a) Transaminasa de glutamina: Pirofosfato de sodio 0.05 M pH 8.5 y β -mercaptoetanol 10 mM. b) ω -amidasa: Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 0.01 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. c) Glutaminasa: Tris-HCl 200 mM pH 8 (para la determinación de amonio por medio de la glutamato deshidrogenasa) y Fosfato de potasio monobásico 0.1 M pH 8 (para la determinación de amonio colorimétricamente). d) Glutamato sintasa: Cloruro de potasio 0.1 M pH 7.6 y β -mercaptoetanol 0.05%.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMINA.

La transaminasa de glutamina se determinó colorimétricamente midiendo la acumulación de 2-oxoglutarato a 500 nm. La reacción se efectuó con 100 μ l de extracto celular más 400 μ l de coctel (50 μ l de gln 0.2 M, 50 μ l de glioxalato 0.2 M, 50 μ l de 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) 0.006 M, 50 μ l de fosfato de piridoxal 0.002 M, 100 μ l de borato de sodio 0.75 M pH 8.5 y 100 μ l de agua). A los tiempos 0, 45 y 90 minutos a 37°C, la reacción se paró con 100 μ l de ácido sulfosalicílico al 20%, se centrifugó 3 minutos en la

microfuga, al sobrenadante se le adicionaron 250 μ l de vainillina (vainillina 4.5%, HCl 3 N en etanol al 50%), se calentó durante 30 minutos a 92 °C, se dejó enfriar, se adicionaron 250 μ l de hidróxido de sodio 5N y se leyó la densidad óptica a 500 nm (64).

En las determinaciones de la transaminasa de glutamina, donde se utilizaron diferentes 2-oxoácidos, estos se sustituyeron por glioxalato en la reacción a una concentración de 20 mM, excepto para β -fenilpiruvato e imidazol-piruvato que fueron de 10 mM y de 3-indolpiruvato que fue de 5 mM.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA DE GLUTAMATO.

La actividad de la transaminasa de glutamato se determinó midiendo la producción de glicina. La reacción se efectuó con 200 μ l de extracto celular y 800 μ l de coctel (100 μ l de glutamato 0.2 M, 100 μ l de glioxalato 0.2 M, 100 μ l de DON 0.006 M, 100 μ l de fosfato de piridoxal 0.002 M, 200 μ l de buffer borato de sodio 0.75 M pH 8.5 y 200 μ l de agua) a los tiempos 0, 45 y 90 minutos a 37 °C. Se paró la reacción con 5 ml de etanol al 80%, se calentó a ebullición 10 minutos, se centrifugó 10 minutos a 10 krpm, se decantó, y el sobrenadante se liofilizó. La glicina se determinó en un analizador de aminoácidos (Aminco).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ω -AMIDASA.

La actividad de la ω -amidasa se determinó espectrofotométricamente a través de medir la acumulación de sus productos, el 2-oxoglutarato y el amonio, por medio de la glutamato deshidrogenasa (bovina) a 340 nm.

La reacción se efectuó con 200 μ l de extracto más 800 μ l de coctel (200 μ l de 2-oxoglutarato 0.05 mM pH 7, 200 μ l de Tris-HCl 250 mM, β -mercaptoetanol 10 mM pH 8.5, y 400 μ l de agua) a los tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 100 μ l de ácido tricloroacético al 17%, se centrifugó 3 minutos en la microfuga y el sobrenadante se decantó y se neutralizó a pH 7 con una solución de hidróxido de sodio. Se tomaron 200 μ l de muestra de la primera reacción y se agregaron 800 μ l de coctel (200 μ l de Tris-HCl 250 mM pH 7.2, 100 μ l de 2-oxoglutarato 200 mM, 50 μ l de NADH 5 mM, 450 μ l de agua). La reacción se efectuó con 5 μ l de glutamato deshidrogenasa (bovina); se determinó a 340 nm la desaparición de NADH correspondiente a la cantidad de amonio producido en la primera reacción. Para la determinación del 2-oxoglutarato se reemplazó en el coctel, al 2-oxoglutarato por amonio a la misma concentración (55).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINASA.

La actividad de la glutaminasa se determinó a través de medir sus productos: el amonio espectrofotométricamente y colorimétricamente, y la utilización de la glutamina y la aparición del glutamato en un analizador de aminoácidos.

Para la determinación de amonio espectrofotométricamente, la reacción se efectuó con 200 μ l de extracto más 800 μ l de coctel (200 μ l de glutamina 0.2 M, 200 μ l de buffer Tris-HCl 200 mM pH 8 y 400 μ l de agua). A los tiempos 0, 10, 15 y 30 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con 100 μ l de ácido tricloroacético al 17%, se centrifugó 3 minutos en microfuga, se decantó en otro tubo y se neutralizó a pH 7. Se determinó la formación de amonio por medio de la glutamato deshidrogenasa (bovina) a 340nm como en el caso de la actividad de ω -amidasa (65).

Para la determinación de amonio colorimétricamente, la reacción se efectuó con 50 μ l de extracto más 200 μ l de coctel (125 μ l de glutamina 10 mM y 75 μ l de buffer fosfato de potasio monobásico 0.1 M pH 8) a los tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con 250 μ l de ácido tricloroacético al 1.5%, se centrifugó 2 minutos en microfuga y se decantó el sobrenadante en otro tubo. Se tomaron 20 μ l del sobrenadante y se le agregaron 180 μ l de agua, 1 ml de solución I (fenol 0.10 M y nitroprusiato de sodio 0.05 gr/lt) y 1 ml de solución II (hidróxido de sodio 0.12 M e hipoclorito de sodio 0.42 gr/lt) se agitó, se dejó reposar por 1 hr y se leyó la densidad óptica a 625nm (66).

Para la determinación de la glutamina y el glutamato, la reacción se efectuó con 200 μ l de extracto celular y 800 μ l de coctel (200 μ l de gln 0.2 M, 200 μ l de buffer Tris-HCl 200 mM pH 8 y 400 μ l de agua) a los tiempos 0, 15 y 30 minutos a 37°C, se detuvo la reacción con 5ml de etanol al 80%, se calentó a ebullición 10 minutos, se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm, se

decantó, y el sobrenadante se liofilizó. La glutamina y el glutamato se determinaron en un analizador de aminoácidos (Aminco).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO SINTASA.

La actividad de glutamato sintasa se determinó siguiendo la oxidación de la coenzima NADPH, espectrofotométricamente a 340nm (37). La reacción lleva 100 μ l de extracto más 800 μ l de coctel (100 μ l de buffer Hepes 0.91 M más 10% de β -mercaptoetanol pH 8.5, 150 μ l de 2-oxoglutarato 20 mM, 100 μ l de NADPH 1.6 mM, y 450 μ l de agua) y se inició la reacción con 100 μ l de glutamina 50 mM.

DETERMINACION DE PROTEINA.

La proteína de los extractos celulares se determinó por el método de Lowry (67).

PURIFICACION DE BACTEROIDES.

Se machacaron 6 grs de nódulos de los frijoles infectados con *Rhizobium etli*, con 15ml de buffer de extracción (cloruro de sodio 0.15 M, fosfato de potasio monobásico 50 mM pH 7.6), se centrifugaron 5 minutos a 3 krpm, y el sobrenadante se volvió a centrifugar 15 minutos a 15 krpm. La pastilla se resuspendió en 2 ml de buffer de extracción. Se colocó 1 ml de la suspensión en un gradiente discontinuo de percoll (24.5 ml de percol, 3.5ml de buffer de fosfato de potasio monobásico 0.5 M más cloruro de sodio 1.5 M pH 7.6, y 7 ml de agua), se centrifugó 50 minutos a 20 krpm, se recolectó la fracción de los bacteroides, se diluyeron 1:10 con

buffer de extracción, se centrifugaron 20 minutos a 15 krpm (68), la pastilla se resuspendió en 2 ml de buffer de extracción dependiendo de la actividad enzimática que se determinó.

RESULTADOS

La glutamina es considerada uno de los donadores universales de nitrógeno (1,25,26). En algunos microorganismos se ha propuesto como el correpresor del catabolismo nitrogenado (2,3) y en *Neurospora* y *Saccharomyces* se ha propuesto que puede ser un punto importante de control para coordinar el metabolismo de nitrógeno y carbono (4,5,56,59). El estudio de la asimilación de la glutamina se ha realizado en diversos sistemas celulares, en donde se han encontrado diferentes enzimas capaces de utilizar a la glutamina como sustrato: la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa, las transamidadas de glutamina, la oxidasa de L-aminoácidos, la glutamato sintasa y la glutaminasa.

La transaminasa de glutamina es un enzima que permite a la glutamina donar su nitrógeno amino para dar diversos aminoácidos y transamina eficientemente con muy diversos 2-oxoácidos (48,50).

En *R. etli* la glutamina es asimilada por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa (69). La actividad de la transaminasa de glutamina en *R. etli* es similar a la actividad reportada en *S. cerevisiae* bajo condiciones microaerofílicas, en donde la transaminasa de glutamina utiliza como sustratos a los 2-oxoácidos glioxalato y piruvato (70), y a la actividad en *N. crassa* en donde utilizó como sustrato al 2-oxoácido fenilpiruvato (64). Dado a que la actividad de la transaminasa de glutamina en *R. etli* se midió en extractos celulares, se determinó la estequiometría de la reacción que cataliza esta enzima para demostrar la producción equimolar de sus productos, ya que el 2-

oxoglutamato podría provenir de la reacción de la glutamina con una oxidasa de L-aminoácidos que da como productos 2-oxoglutamato y amonio. La glicina podría provenir de la reacción acoplada de una glutaminasa que degrada glutamina a glutamato y amonio, con una transaminasa de glutamato-glioxalato. La estequiometría de la transaminasa de glutamina se determinó en presencia de 6-diazo-5-oxo-norleucina (DON) que es un inhibidor de transaminasas, el cual se ha demostrado que inhibe también la actividad de la ω -amidasa (54). El uso de este inhibidor nos permite medir la acumulación del 2-oxoglutamato, ya que evita la degradación de este compuesto por la ω -amidasa. También se determinó la estequiometría de la transaminasa de glutamina en presencia de los análogos de la glutamina; la metionina sulfona (MSO) y la metionina sulfoximina (MS) los cuales se ha demostrado que son sustrato de la transaminasa de glutamina de mamíferos (48).

En la Tabla 1 se muestra que existe una producción equimolar de ambos productos de la transaminasa de glutamina, que en ausencia de alguno de los sustratos, glutamina ó glioxalato, no se detecta actividad, que en presencia de aminoacético (AOA inhibidor general de transaminasas) inhibe aproximadamente un 70% la producción de glicina, así como del 2-oxoglutamato, y que cuando la reacción se efectuó sin DON (inhibidor de la ω -amidasa) la acumulación del 2-oxoglutamato es similar a la que se obtiene cuando se determina esta actividad en presencia de DON (completo). Esto sugiere que la ω -amidasa no es activa bajo estas condiciones de ensayo. En presencia de metionina sulfona o metionina

TABLA 1

Estequiometría de la transaminasa de glutamina

ENSAYO ^a	ACTIVIDAD ^b ESPECIFICA	µmoles por ml	
		GLICINA	2-OXOGM
Completo	12.98	1.00	1.24
Sin glutamina	N.D. ^c	0.05	N.D.
Sin glioxalato	N.D.	N.D.	N.D.
CON AOA	3.61	0.34	0.34
SIN DON	11.21	1.04	1.08
CON MSO	5.55	1.11	0.53
CON MSO, SIN GLN	4.2 ^d	0.41	N.D.
CON MS	6.47	1.14	0.62
CON MS, SIN GLN	3.1	0.30	0.038

^aLos extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato a las 14 hrs.

^bExpresado en nanomoles de 2-oxoglutarato producido por minuto por mgP.

^cExpresado en nanomoles de glicina producida por minuto por mgP.

^dNo detectado.

sulfoximina y glutamina, la producción de 2-oxoglutarato disminuye aproximadamente un 50% y la producción de glicina permanece similar, mientras que sin glutamina la producción de glicina disminuye y no hay acumulación de 2-oxoglutarato. Estos

resultados indican que tanto el MSO como el MS son sustratos de la transaminasa de glutamina.

La glicina, producto de la transaminasa de glutamina, puede ser también el producto de una transaminasa de glutamato. Para confirmar que la relación equimolar de estos productos (Tabla 1) es debida a la actividad de la transaminasa de glutamina, se determinó la actividad de la transaminasa de glutamina y glutamato con glioxalato. Los resultados de la Tabla 2 muestran que en presencia de glutamina hay producción de glicina y 2-oxoglutaramato, mientras que en presencia de glutamato la producción de glicina es menor y no hay acumulación de 2-oxoglutaramato. La actividad de la transaminasa de glutamato es 1.5 veces menor que la de la transaminasa de glutamina y la suma de las dos actividades es similar a la actividad enzimática cuando se utilizan glutamina y glutamato como sustratos. Estos resultados indican que la transaminasa de glutamina es una enzima diferente a la transaminasa de glutamato.

TABLA 2

Actividad de la transaminasa de glutamina y glutamato

ENSAYO ^a	ACTIVIDAD ^b ESPECIFICA	μ moles por mgP	
		GLICINA	2-OXOGM
Glutamina	8.1	0.73	0.50
Glutamato	5.4	0.49	N.D. ^c
Glutamina y Glutamato	13.7	1.24	0.56

^aLos extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato a las 14 hrs.

^bExpresado en nanomoles de glicina producida por minuto por mgP.

^cN.D, no detectado.

En mamíferos se han reportado tres diferentes transaminasas de glutamina que difieren esencialmente en su especificidad por diferentes 2-oxoácidos y su localización intracelular. Para explorar la posibilidad de que existiera más de una transaminasa de glutamina en *R. etli*, que tuvieran diferentes especificidades por 2-oxoácidos, así como para conocer el mejor sustrato de esta enzima, se determinó la actividad de la transaminasa de glutamina utilizando diferentes 2-oxoácidos.

TABLA 3

Especificidad por 2-oxoácidos de la transaminasa de glutamina

2-OXOACIDOS	ACTIVIDAD RELATIVA ^a (%)
Glioxalato	100.00
Piruvato	79.69
2-oxobutirato	77.74
2-oxovalerato	59.17
2-oxosuccinamato	56.68
2-oxoisocaproato	33.25
2-oxoadipato	26.63
2-oxoglutarato	17.15
β -fenilpiruvato (10 mM)	14.10
Imidazole-piruvato (10 mM)	13.81
2-oxoisovalerato	11.37
β -hidróxipiruvato	4.66
δ -hidróxifenilpiruvato	3.73
DL-2-oxo- β -metil-n-valerato	2.87
3-indolepiruvato (5 mM)	N.D. ^b
2-oxo- β -metiol-butirato	N.D.
Oxaloacetato	N.D.

Los extractos celulares se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato a las 14 hrs.

^aExpresado en porcentaje de 2-oxoglutarato formado por minuto por mgP.

^bN.D., no detectado.

Los resultados de la Tabla 3 muestran que la transaminasa de glutamina tiene la mayor actividad cuando se utiliza glioxalato como sustrato, siguiendo en orden decreciente piruvato, 2-oxobutírico, 2-oxovalérico y 2-oxosuccinamato. La actividad que presentó la transaminasa de glutamina, con los diversos 2-oxoácidos, sugiere la presencia de una sola transaminasa de glutamina, similar a la transaminasa de glutamina de hígado de

mamíferos que tiene la mayor especificidad por glioxalato.

Para conocer la función de la transaminasa de glutamina, se determinó su actividad en las diferentes fases del crecimiento, su regulación por carbono, sus sustratos y productos. Como se muestra en la Figura 2, la actividad de la transaminasa de glutamina no varía durante las diferentes fases del crecimiento de *R. etli*. También se encontró que la actividad de la transaminasa de glutamina es similar cuando *R. etli* crece en diferentes fuentes de carbono y amonio como fuente de nitrógeno; o en MM más glutamina más succinato, o en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, o en MM más alanina (un posible producto de la transaminasa de glutamina); o en MM más aspartato (no es sintetizado por la transaminasa de glutamina). Y solamente se encuentra una actividad baja cuando *R. etli* crece en un medio rico de PY (Fig. 3).

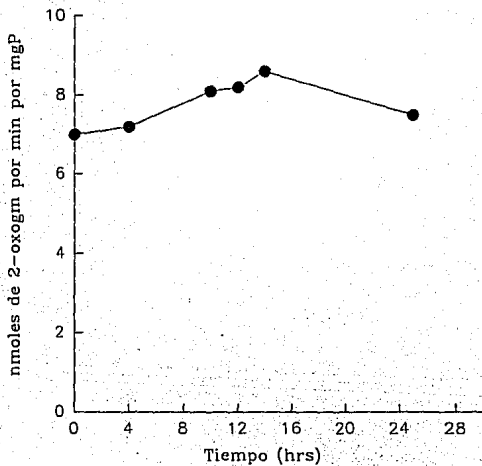


FIGURA 2. Actividad de la transaminasa de glutamina en las diferentes fases del crecimiento.

Los extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato.

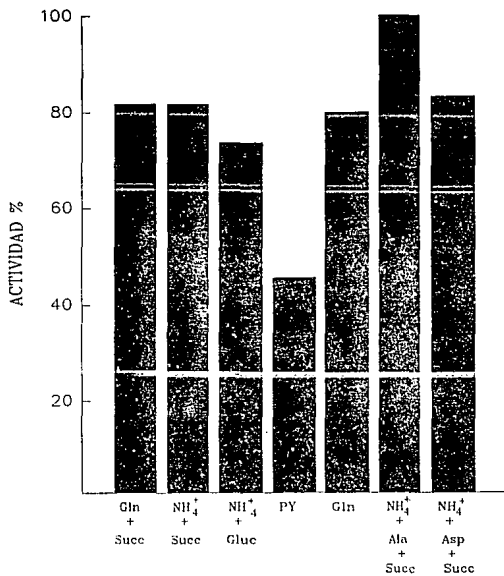


FIGURA 3. Regulación de la transaminasa de glutamina.

Los extractos se obtuvieron de células crecidas a las 14 hrs.

La transaminasa de glutamina *in vivo* es una enzima que funciona acoplada a la ω -amidasa. Esta enzima hidroliza el 2-oxoglutarato sintetizado por la transaminasa de glutamina a amonio y 2-oxoglutarato. Los resultados de la Tabla 1 sugieren que bajo estas condiciones la actividad de la ω -amidasa no está acoplada a la transaminasa de glutamina, debido a que sin DON la actividad es similar a la actividad encontrada en presencia de DON, inhibidor de la transaminasa de glutamina. De tal forma se establecieron las condiciones apropiadas para determinar la actividad de la ω -amidasa y se determinó la estequiometría de sus productos, 2-oxoglutarato (2-OXOG) y amonio.

TABLA 4

Estequiometría de la actividad de la ω -amidasa

ENSAYO	2-OXOG ^a	AMONIO ^b
Completo	4.2	4.8

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

^aExpresado en nmoles de 2-oxoglutarato producido por minuto por mgP.

^bExpresado en nmoles de amonio producido por minuto por mgP.

Los resultados en la Tabla 4 muestran una relación equimolar entre ambos productos de la ω -amidasa (2-oxoglutarato y el amonio). Estos resultados indican que la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa opera en *R. etli*.

Cuando *R. etli* crece en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, excreta amonio al medio de cultivo. Esta excreción es varias veces mayor a la que presenta *R. etli* cuando crece en MM más glutamina más succinato. Estos resultados indican que existe una mayor degradación de la glutamina cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono, dado que la actividad de la transaminasa de glutamina en esta condición es similar a la de MM más glutamina más succinato. Estos resultados sugieren que el amonio, producto de la degradación de la glutamina es reasimilado por la glutamino sintetasa cuando el succinato se encuentra presente en el medio succinato y/o existe otra actividad enzimática (L-aminoácido oxidasa o glutaminasa) que degrada la glutamina a amonio, cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono. En cuanto a la actividad de la glutamino sintetasa en *R. etli*, se encontró que tanto la actividad de GSI como de GSII se encuentran bajas, en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono comparado con un MM más glutamina más succinato (69).

La participación de la L-aminoácido oxidasa en la degradación de la glutamina es poco probable, debido a que se ha reportado que la glutamina reprime ha esta enzima (60). La actividad de la glutaminasa se ha encontrado en diferentes microorganismos (71,72), como en *E. coli* (38) y en *S. cerevisiae* (39); en este último donde se han reportado dos glutaminasas. Debido a que los resultados de la excreción de amonio en *R. etli* sugerían también la presencia de la glutaminasa, se establecieron las condiciones apropiadas para

la determinación de esta enzima y su estequiometría.

Los resultados en la Tabla 5 muestran una relación equimolar entre la desaparición del sustrato y ambos productos; en ausencia de glutamina o sin extracto celular no se detecta actividad de glutaminasa.

TABLA 5

Estequiometría de la actividad enzimática de glutaminasa

ENSAYO ^a	ACT. ESPECIFICA ^b	-GLN	+GLU ^c	+NH ₄ ⁺ ^c
Completo	93	0.9	1.2	1.3
Sin glutamina	N.D. ^d	N.D.	N.D.	N.D.
Sin extracto	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^aLos extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina como fuente de nitrógeno y carbono a las 20 hrs.

^bExpresado en nanomoles de amonio producido por mgrP por min.

^cExpresado en μ moles producido a los 15 min.

^dN.D, no detectado.

Para conocer la función de la glutaminasa de *R. etli* se estudió su regulación durante las distintas fases del crecimiento, así como su regulación por la fuente de nitrógeno y de carbono, por su sustrato y por sus productos.

Se encontró que la actividad de la glutaminasa varía durante las diferentes fases del crecimiento de *R. etli* (Fig. 4). La regulación de la glutaminasa de *R. etli* en los diferentes medios de

cultivo y fases del crecimiento (Figs. 5,6,7), muestra que durante la fase exponencial del crecimiento la glutaminasa se encuentra alta en las diferentes condiciones del crecimiento, encontrándose la actividad más baja en cloruro de amonio más succinato (Fig. 5).

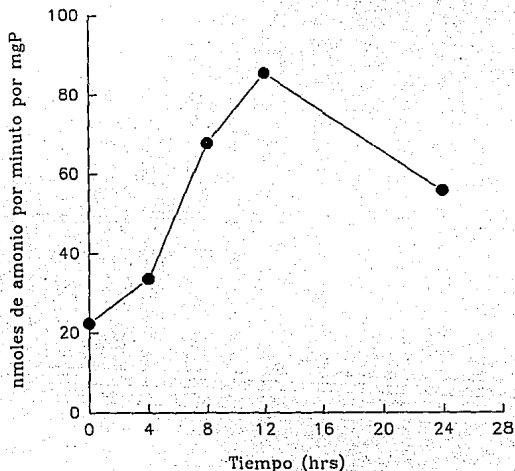


FIGURA 4. Actividad de la glutaminasa durante las diferentes fases del crecimiento.

Los extractos se obtuvieron de células crecidas en medio mínimo suplementado con glutamina más succinato.

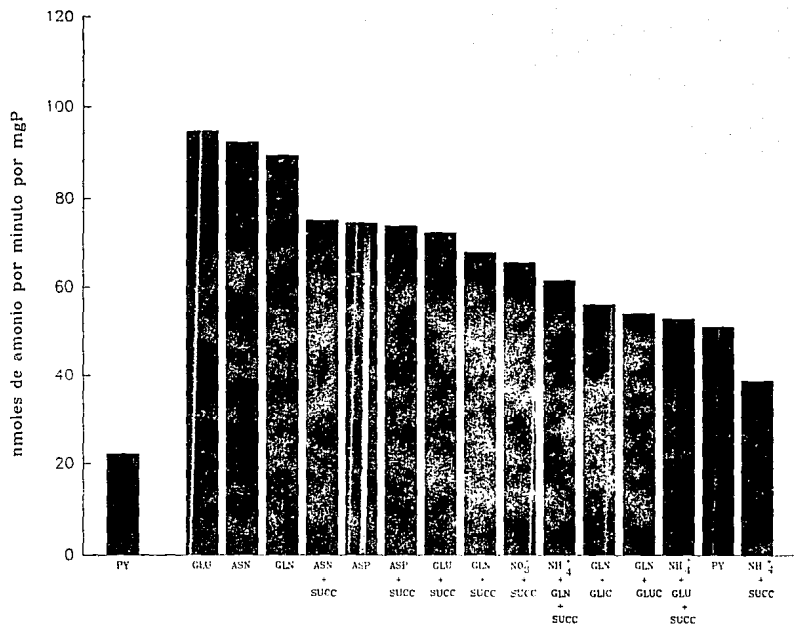


FIG 5. Regulación de la glutaminasa durante la fase exponencial del crecimiento.

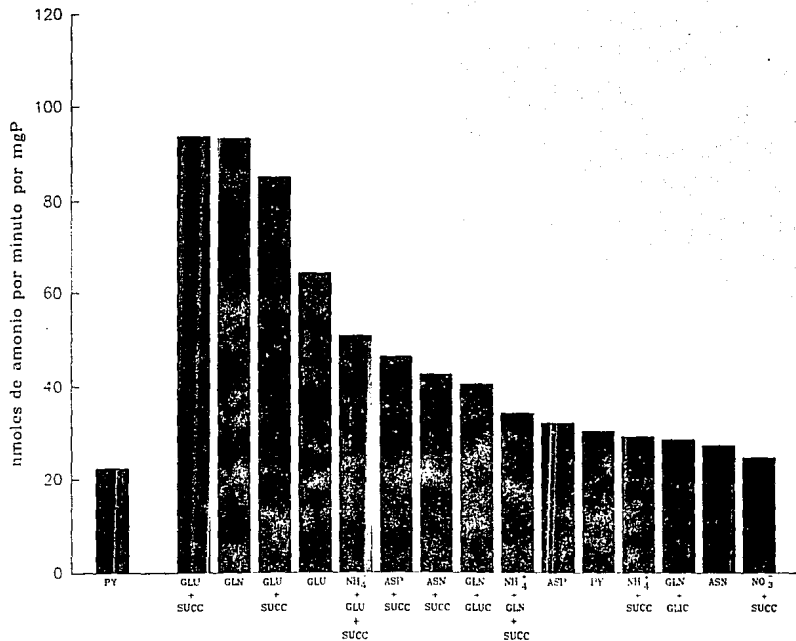


FIG. 6 Regulación de la glutaminasa durante la fase pre-estacionaria.

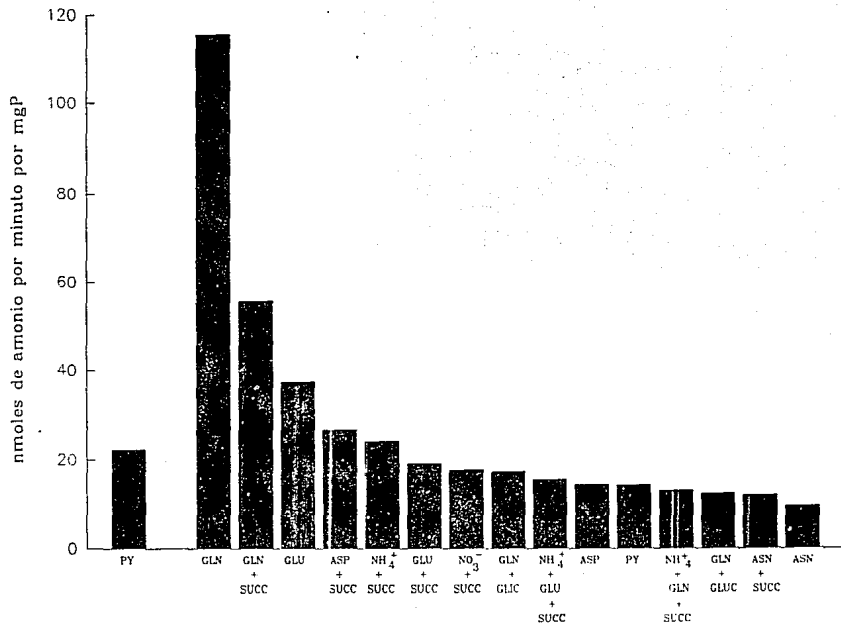


FIG. 7 Regulación de la glutaminasa durante la fase estacionaria..

En la fase preestacionaria, se observa que la actividad de la glutaminasa disminuye en las diferentes condiciones, excepto cuando *R. etli* crece en MM más glutamato más succinato, en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, en MM más glutamina más succinato, en MM más glutamato como fuente nitrógeno y carbono y en MM más amonio más glutamato más succinato (Fig. 6). Durante la fase estacionaria la glutaminasa sólo se encuentra elevada en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono y en MM más glutamina más succinato (Fig. 7).

La glutaminasa de *R. etli* es un enzima que se induce en presencia de su sustrato. Así la actividad de la glutaminasa se encuentra elevada cuando se utiliza a la glutamina como fuente de nitrógeno o cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono, comparada con la actividad encontrada en MM más amonio más succinato (Figs. 5,6).

La glutaminasa de *R. etli* se reprime por amonio. Así la actividad de la glutaminasa es más elevada cuando se crece a *R. etli* en MM más glutamina más succinato, o MM más glutamato más succinato, comparado con la actividad cuando se crece a *R. etli* en estas condiciones más amonio (Fig. 6).

La glutaminasa es un enzima que también se regula por la fuente de carbono, debido a que cuando *R. etli* crece en MM más glutamina como fuente de nitrógeno, más succinato o glicerol o glucosa como fuente de carbono, la actividad de la glutaminasa es menor que cuando crece en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Cuando se utiliza succinato como fuente de carbono, la

represión de la glutaminasa es menor comparada con el glicerol o glucosa, a pesar de que el succinato es considerado la mejor fuente de carbono para *R. etli* (Figs. 6,7).

Cuando *R. etli* crece en MM más aspartato o asparagina (no son sustrato o producto de la glutaminasa), la actividad enzimática de la glutaminasa se encuentra elevada únicamente durante la fase exponencial del crecimiento, a diferencia de MM más glutamato, en donde se presenta alta actividad de la glutaminasa durante la fase exponencial y preestacionaria, o de MM más glutamina en donde la glutaminasa, se encuentra elevada durante las diferentes etapas del crecimiento. Las actividades de glutaminasa más bajas se encuentran cuando *R. etli* crece en una fuente de nitrógeno inorgánico y succinato como fuente de carbono y en un medio rico de PY (Figs. 5,6,7).

Para conocer las enzimas que participan en la degradación de la glutamina en *R. etli* durante la simbiosis, se determinaron las actividades de la glutamato sintasa, de la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa, y de la glutaminasa, en bacteroides de *R. etli*. Estas se compararon con las actividades enzimáticas en vida libre, cuando *R. etli* crece en MM más amonio más succinato o en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Los bacteroides se purificaron por un gradiente de percoll y se determinó su pureza por microscopía óptica.

Los resultados de la Tabla 6 muestran que, cuando *R. etli* crece en MM más amonio más succinato, la glutamina es degradada principalmente por la glutamato sintasa y la glutaminasa, mientras

que cuando *R. etli* crece en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, este aminoácido es degradado principalmente por la glutaminasa, al igual que en los bacteroides de *R. etli*.

TABLA 6

Actividades enzimáticas en bacteroides

ACT. ENZIMÁTICA	VIDA LIBRE		BACTERIODE ^a
	A	B	
Transaminasa de glutamina ^b	12.9	6.4	3.1
amidasa ^c	N.D. ^e	10.0	3.9
Glutamato sintasa ^d	27.1	14.1	4.6
Glutaminasa ^c	32.0	93.6	64.0

Las actividades enzimáticas se determinaron en células crecidas en amonio más succinato (A) y en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno (B).

^aLos bacteroides fueron obtenidos de nódulos de 25 días.

^bExpresado en nmoles de 2-oxoglutarato producido por minuto por mgP.

^cExpresado en nmoles de amonio producido por minuto por mgP.

^dExpresado en nmoles de NADPH oxidado por minuto por mgP.

^eN.D., no determinado.

DISCUSION

Nosotros hemos encontrado que en *R. etli* la glutamina es degradada por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa, produciéndose a un aminoácido, 2-oxoglutarato y amonio (69); y que puede utilizar este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono, a diferencia de otras bacterias gram negativas como *E. coli* (31), o del hongo *N. crassa* (64).

En este trabajo hemos encontrado que la transaminasa de glutamina en *R. etli*, es un enzima que puede utilizar como sustratos otros análogos de la glutamina, como la metionina sulfoximina y metionina sulfona (Tabla 1), como se ha reportado para las transaminasas de glutamina de mamíferos, y que su actividad se inhibe en presencia del ácido aminooxiacético, inhibidor general de las transaminasas. La transaminasa de glutamina es un enzima diferente a la transaminasa de glutamato (Tabla 2), debido a que la actividad específica de ésta es menor que la de la transaminasa de glutamina, y a que cuando se determina la actividad de transaminasa en presencia de ambos sustratos, glutamina y glutamato, se encuentra una actividad específica que corresponde a la suma de las dos actividades de transaminasa independientes. Esto demuestra que la glicina determinada en la estequiometría (Tabla 1) es producto de la transaminasa de glutamina.

La transaminasa de glutamina utiliza como mejores sustratos al glioxalato y al piruvato. La especificidad por 2-oxoácidos que presenta la transaminasa de glutamina (Tabla 3), sugiere la

existencia de una transaminasa de glutamina, al igual como se ha propuesto en *S. cerevisiae* (58). La transaminasa de glutamina en *R. etli* tiene preferencia por 2-oxoácidos de cadena sencilla y, de acuerdo con su especificidad por estos compuestos, esta enzima es parecida a la transaminasa de glutamina de hígado de mamíferos (51).

La transaminasa de glutamina es una enzima cuya actividad específica es similar en las diferentes condiciones de crecimiento y sólo se encuentra baja su actividad en medio rico de PY, por lo que concluimos que esta enzima se regula muy poco (Figs. 2,3). Esto es similar a lo que ocurre en *N. crassa* (64) y a diferencia de *S. cerevisiae*, en donde la transaminasa de glutamina se regula por glutamina, lisina, o glicina (58). Estos resultados sugieren que la transaminasa de glutamina es un enzima necesaria durante las diferentes condiciones y fases del crecimiento, probablemente para mantener el balance de compuestos nitrogenados utilizados para el crecimiento celular y el recambio de proteínas, por tal motivo en un medio rico de aminoácidos, como PY, la actividad de la transaminasa disminuye (Fig. 3)

El 2-oxoglutarato sintetizado por la transaminasa de glutamina es hidrolizado por la ω -amidasa a amonio y 2-oxoglutarato, como lo muestra la estequiometría de la reacción (Tabla 4). Estos resultados muestran por primera vez que en un procarionte, como es *R. etli*, opera la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa, y que esta enzima puede tener un papel importante en la síntesis irreversible de alanina y glicina. Este

Último aminoácido, además de utilizarse para la síntesis de proteínas, se utiliza en la síntesis de purinas, porfirinas y glutatión.

En contraste con las demás transaminasas conocidas que son reversibles y poseen una constante de equilibrio alrededor de 1.0 (73), la transaminasa de la glutamina es irreversible, ya que el 2-oxoglutarato no se acumula debido a la gran afinidad de la ω -amidasa por este sustrato, el cual es hidrolizado a 2-oxoglutarato y amonio (74).

La irreversibilidad de la transaminasa de glutamina favorece la síntesis de glicina y alanina, y con la participación de otras transaminasas, a la formación de glutamato y otros aminoácidos, de tal forma que esto puede ser una manera de mantener el balance de los compuestos nitrogenados. Así, una posible función de la transaminasa de glutamina podría ser la de degradar glutamina para mantener las pozas de aminoácidos. Otra característica de la transaminasa de glutamina de *R. etli* es que tiene afinidad, y transamina eficientemente, por diversos 2-oxoácidos (48).

Se demostró por primera vez en *R. etli* la actividad de la glutaminasa. La glutaminasa es un enzima que se induce por glutamina, se reprime por amonio, se regula por la fuente de carbono (Figs. 5,6,7) y su actividad varía en las diferentes fases del crecimiento (Fig. 4). Durante la fase exponencial, la glutaminasa se encuentra alta en las diferentes condiciones de crecimiento, encontrándose la actividad más baja en MM más amonio más succinato. Es importante observar que la glutaminasa se

encuentra alta durante la fase exponencial del crecimiento, independientemente de la fuente de nitrógeno o carbono que sea utilizada. Estos resultados sugieren que en *R. etli* la glutamina, ya sea la que proviene del medio de cultivo o la sintetizada por la célula, es degradada por la glutaminasa, es decir la glutamina es degradada y resintetizada (Fig. 5).

Durante la fase pre-estacionaria, la actividad de la glutaminasa baja en las diferentes condiciones de crecimiento, excepto en MM más glutamina o glutamato como fuente de nitrógeno o fuente de nitrógeno y carbono, lo que sugiere que la glutamina es un inductor de la glutaminasa. Posiblemente, durante esta fase del crecimiento, disminuye la síntesis de la glutamina y por lo tanto su degradación. La alta actividad de glutaminasa en MM más glutamato más succinato puede ser debida a la elevada actividad de la glutamino sintetasa presente en esta condición, dando lugar a una mayor síntesis de la glutamina, el inductor de la glutaminasa; algo similar podría estar ocurriendo en MM más glutamato como fuente de nitrógeno y carbono (Fig. 6).

Durante la fase estacionaria, la actividad de la glutaminasa sólo se mantiene alta en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, y en MM más glutamina más succinato. Disminuye en las otras condiciones de crecimiento, aún en MM más glutamato como fuente de nitrógeno, o como fuente de nitrógeno y carbono, en donde se había mantenido alta. Esto podría ser debido a que durante esta fase del crecimiento la actividad de la glutamino sintetasa disminuye, por lo tanto también disminuye la síntesis de glutamina

y como consecuencia la actividad de la glutaminasa. La elevada actividad de la glutaminasa en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, y en MM más glutamina más succinato, indica que la glutamina es inductor de la glutaminasa (Fig. 7).

La glutaminasa es un enzima que se regula por la fuente de carbono, debido a que cuando *R. etli* crece en MM más glutamina como fuente de nitrógeno más succinato o glicerol o glucosa, la actividad de la glutaminasa es menor que cuando crece en MM más glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Cuando utiliza como fuente de carbono succinato, la represión es menor comparada con el glicerol o la glucosa, a pesar de que el succinato es considerado la mejor fuente de carbono para *R. etli* (Figs. 5,6). Estos resultados nos hace proponer que una función de la glutaminasa es la de utilizar óptimamente los esqueletos de carbono de la glutamina.

La glutaminasa en *R. etli* se reprime por amonio; así, las actividades de la glutaminasa son más elevadas cuando *R. etli* crece en MM más glutamina más succinato o en MM más glutamato más succinato, comparado con las actividades de glutaminasa en estas condiciones más amonio (Figs. 5,7). Cuando *R. etli* crece en MM más amonio más succinato, o en MM más nitrato más succinato, o en medio rico de PY, la actividad de la glutaminasa es menor comparada con la actividad en aminoácidos como fuente de nitrógeno (Fig. 5). Estos resultados sugieren que en estas condiciones la gluamina también es degradada y resintetizada, pero que la actividad disminuye debido a que el amonio reprime a la glutaminasa y que la

baja actividad encontrada en el medio rico de PY posiblemente se deba a que la degradación de aminoácidos da como producto amonio, el cual reprime la actividad de la glutaminasa. Los resultados obtenidos sugieren que una función de la glutaminasa es el mantener el balance entre glutamina y glutamato, siendo estos dos aminoácidos los donadores universales del nitrógeno celular, que juegan un papel central en el metabolismo de carbono y nitrógeno, ya que de su concentración intracelular va a depender el balance de los compuestos de nitrógeno.

El papel de la oxidasa de L-aminoácidos en la degradación de la glutamina es poco probable, debido a que cuando se determinó la actividad de la transaminasa de glutamina sin glioxalato, no se detectó el 2-oxoglutaramato (Tabla 1), lo que indica que la glutamina no es degradada por esta vía. Las oxidasas de L-aminoácidos de microorganismo generalmente no utilizan glutamina como sustrato (44,45,46), y además la glutamina reprime esta enzima (60).

El hecho de haber encontrado actividad de glutaminasa en *R. etli*, bajo diferentes condiciones indica que la glutamina es degradada y resintetizada como en *N. crassa*, en donde se ha propuesto que es necesario degradar y resintetizar glutamina para contribuir a un gasto de energía y poder reductor, contribuyendo a una oxidación óptima de esqueletos de carbono en el ciclo de Krebs (5).

En *R. etli*, la glutamina es asimilada a dos moléculas de glutamato por la glutamato sintasa, contribuyendo a la síntesis de glutamato con su respectivo gasto de energía y poder reductor (37),

y es degradada por la transaminasa de glutamina a amonio, 2-oxoglutarato y un aminoácido (65), o bien por la glutaminasa a glutamato y amonio. Estos productos son asimilados por la glutamino sintetasa para resintetizar glutamina. De tal forma, la presencia de estas enzimas contribuye a la formación de un ciclo, donde la glutamina es continuamente degradada y resintetizada (Fig 8)

Estudios de marcaje con ^{15}N , realizados cuando *R. etli* crece en MM más amonio más succinato, muestran que después de haber marcado con L-[amido- ^{15}N] glutamina durante 30 minutos la distribución de la marca se encuentra principalmente en amonio (84.34%), en donde el 18.4% de la marca de la glutamina se encuentra en el grupo amino. Estos datos indican que una gran proporción de la glutamina es degradada a amonio y que el amonio junto con el glutamato marcado en el grupo amino son asimilados por la glutamino sintetasa, para sintetizar glutamina marcada en el grupo amino, estos datos demuestran que en *R. etli* la glutamina es degradada y resintetizada (75).

Los procesos cíclicos son comunes en el metabolismo celular; éstos funcionan en oxidaciones y síntesis, en la generación de energía, poder reductor y en el transporte de una variedad de compuestos a través de membranas (76). Sin embargo, existen ciclos en los cuales la función no es aparente, como es el caso cuando una reacción para la síntesis y degradación de un compuesto es catalizado por diferentes enzimas y donde la síntesis consume ATP. Estos ciclos causan una hidrólisis de ATP sin el correspondiente cambio de reactantes, por lo cual a estos ciclos se le ha

identificado con el nombre de ciclos fútiles (76). En el metabolismo de carbohidratos existen tres ciclos en tejidos gluconeogénicos: a) el de glucosa y glucosa-6-fosfato, b) el de fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-difosfato, y c) el de fosfoenol piruvato y piruvato.

El reciclaje de un compuesto puede tener la función en el control metabólico de amplificar los efectos de ligandos alostéricos. Así, por ejemplo, la fosfofructoquinasa es inhibida por ATP, mientras que la fructosa difosfatasa es inhibida por AMP; de esta forma, una baja cantidad de ATP y una alta cantidad de AMP, da como resultado la síntesis de fructosa-1,6-difosfato y su utilización en la glicólisis (77).

El ciclaje de la glutamina en *R. etli* puede contribuir a la síntesis irreversible de la glicina y la alanina, a través de la transaminasa de glutamina. Debido a que la glutamina, además de ser un donador de nitrógeno es también un correpresor del catabolismo nitrogenado (2,3), su recambio puede ser una manera de regular rápidamente su concentración intracelular (76). Esto es debido a que un aumento en la velocidad de síntesis de la glutamina, combinado con una disminución en la velocidad de degradación de ésta, ocasionaría su rápida acumulación y, viceversa, una disminución en la velocidad de su síntesis acompañada de un aumento en su degradación, ocasionaría una rápida disminución en la glutamina intracelular. De esta manera, se regularía rápidamente la concentración de la glutamina en la célula y ésta a su vez regularía las actividades de la síntesis y la degradación del

actividades de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa y de la glutamato sintasa se encuentran bajas y la glutaminasa muy elevada (Tabla 6). Esto sugiere que la degradación de la glutamina por la glutaminasa puede tener un papel importante durante la simbiosis, ya que una de las funciones de la glutaminasa es utilizar óptimamente los esqueletos de carbono de la glutamina.

De las actividades que participan en la degradación de la glutamina, la glutaminasa es la actividad más elevada en los bacteroides lo que sugiere que la degradación de la glutamina por este enzima puede tener un papel importante durante la simbiosis (tabla 6).

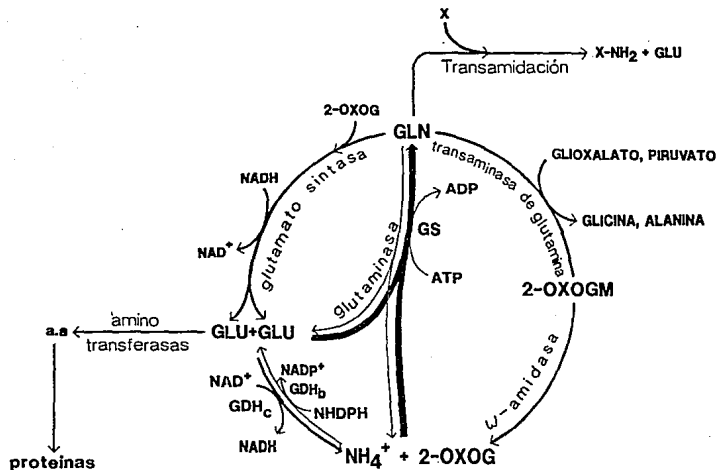
Para conocer la función de la glutaminasa en *R. etli*, recientemente se aisló una mutante (LM16) que no puede crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono y que tiene una actividad muy baja de glutaminasa. Actualmente se está caracterizando la mutante LM16 y un plásmido que complementa esta mutante.

CONCLUSION

En *Rhizobium etli* la glutamina es asimilada por la glutamato sintasa (37), y degradada por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa (69) y la glutaminasa. Los resultados sugieren que la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa tiene un papel importante en la síntesis irreversible de glicina, y alanina, y en mantener el balance de aminoácidos. También que la glutaminasa podría funcionar para mantener un balance entre la glutamina y el glutamato, además de tener un papel fundamental en la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono, cuando utiliza este aminoácido como fuente de carbono. La alta actividad de la glutaminasa encontrada en bacteroides, sugiere que la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono por este enzima puede tener un papel importante durante la simbiosis entre *R. etli* y *P. vulgaris*.

La participación de estas enzimas en la degradación de la glutamina junto con la glutamino sintetasa contribuyen a un ciclo donde la glutamina es degradada y resintetizada (figura 8).

El ciclaje de la glutamina en *R. etli* puede contribuir a la formación irreversible de aminoácidos por transaminación, su recambio puede ser una manera de regular su concentración intracelular y ésta a su vez regularía las actividades de la síntesis y la degradación del nitrógeno celular. Este puede ser un mecanismo general para mantener un balance entre glutamina y glutamato o puede ser un punto importante de control para coordinar el metabolismo de nitrógeno y carbono (Fig. 9)



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-oxoglutarato

FIGURA 8. La asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*.

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., Ed. 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. 1990. Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora Crassa*. Microbiol. Rev. 54: 293.
5. 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.
6. Delwiche, C.C. 1970. The nitrogen cycle. Scientific American. 223:3 136.
7. Lehninger, A.L. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publisher. Inc. New York. USA. p. 335.
8. Delwiche, C. 1981. The cycle of nitrogen and nitrous oxide. John Wiley and SONS. Inc. p. 1.
9. Fenchel, T., and T.H. Blackburn. 1979. Bacteria and mineral cycling. Academic Press, London, G.B.
10. Burns, R.C., and W.F. Hardy. 1975. Nitrogen Fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag. Nueva York.
11. Stower, M.D. 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Ann. Rev. Microbiol. 39: 89.
12. Hardy, R., and Havelka. 1975. Nitrogen fixation research: A key to world food. Science. 188: 633.
13. De-Ming LI, and A. Martin. 1990. Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation. Plant and soil. 129: 195.
14. Jain, V., Garg, N., and H.S. Nainawatee. 1990. Naringenin enhanced efficiency of *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. J. Microbiol. Biotechnology. 6: 434.

15. Somasegaran, P., and B. Ben Bohlool. 1990. Single-strain versus multistrain inoculation: Effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on Chick-Pea, Soybean, and Dry Bean. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3298.
16. Merrick, M.J. 1985. Prospects for the transfer of nitrogen fixation genes to crop plants. AFC. Unit of Nitrogen Fixation University of Sussex. p. 202.
17. Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in underground. *Cell* 56: 203.
18. Okas, A., and B. Hirel. 1985. Nitrogen metabolism in roots. *Anual Review Plant Physiology.* 36: 345.
19. Fisher, R., and S. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* 357: 655.
20. Downie, A., and A. Johnston. 1986. Nodulation of legumes by *Rhizobium*: The recognized Root? *Cell.* 47: 155.
21. Verma S., and S. Long. 1983. The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. *International Review of Citology.* 14: 211.
22. Peters, N.K., and S.R. Long. *Rhizobium meliloti* nodulation gene inducers and inhibitors. *Plant Physiol.* 88: 396.
23. Franssen, H., Vijn, I., Wei Cai Yang, and T. Bisseling. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. 19: 89.
24. Merrick, M. 1988. Nitrogen regulation of nitrogen fixation. Nitrogen Source Control of Microbial Processes. In Sánchez Esquivel Ed. CRC. Press Boca Raton, Florida, USA. p. 170.
25. Meister, A. 1965. Intermediary metabolism of the amino acids. Alton Meister Ed. Biochemistry of amino acids, vol II. Academic Press Inc. p. 593.
26. Sallach, H., and L. Fahien. 1969. Nitrogen metabolism of amino acids. D. Greenberg Ed. Metabolic pathways, vol III, Academic Press Inc. p. 1.
27. Powers, S.G., and A. Meisteris. 1978. Mecanism of the reaction catalyzed by carbamyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 253: 800.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

28. 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. Prusiner, S. Ed, Academic Press Inc. p. 431.
29. Roon, R.J., Ever, H.L., and F. Larimore. 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine nucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 118: 89.
30. Castaño, I., Bastarrachea, F., and A. Covarrubias. 1988. gltBDF operon of *E. coli*. J. Bacteriol. 170: 821.
31. Miller, R., and E. Stadman. 1972. Glutamate Synthase from *E. coli*: an iron-sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. 247: 7407.
32. Tempest, D.W., Meers, J.L. and C.M. Brown. 1973. Glutamate synthase (GOGAT): a key enzymes 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.
33. Tempest, D.W., Meers, J., and C. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in Aerobacter by a hitheto unknown route. J. Biochem. 117: 407.
34. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. NADH-dependent Glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. Bioch, Biophys. Res. Commun. 92: 127.
35. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of Glutamate synthase in *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 1688.
36. Lara, M., Blanco, L., Campomanes, M., Calva, E., Palacios, R., and J. Mora. 1982. Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 150: 105.
37. Bravo, A. and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phascoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol. 170: 980.
38. Stadtman, R. 1973. Glutaminases of *Escherichia Coli*: properties, regulation, and evolution. Prusiner, S., and E. Stadman Eds. The enzymes of glutamine metabolism. Prusiner, S. Ed. Academic Press Inc. p. 293.
39. Soberón, M., and A. González. 1987. Physiological role of glutaminase activity in *S. cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 133: 1.

40. William, R., Joshua, H., and R. Bernlohr. 1981. Occurrence of an inducible glutaminase in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 148: 365.
41. 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.
42. 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.
43. Smith, E., and M. Watford. 1990. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. J. Biol. Chem. 265: 10631.
44. 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.
45. Pistorius, E.K. and H. voss 1980. Some properties of a Basic L-amino acid oxidase from *Anacystis Nidulans*. Biochimica et Biophysica Acta. 227.
46. Duerre, J., and S. Chakrabarty. 1975. L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*. J. Bacteriol. 121: 656.
47. Thayer, P., and N. Horowitz. 1951. The L-amino acid oxidase of *Neurospora*. J. Biol. Chem. 192: 755.
48. Meister, A., and S. Tice. 1950. Transamination from glutamine to α -Keto acids. J. Biol. Chem. 187: 173.
49. Cooper, A., and A. Meister. 1977. The glutamine transaminase amidase pathway. Critical Reviews Biochem. 4: 281.
50. Cooper, A., and A. Meister. 1972. Isolation and properties of highly purified glutamine transaminase. Biochem. 11: 661.
51. Cooper, A., and A. Meister. 1974. Isolation and properties of a new glutamine transaminase from rat kidney. J. Biol. Chem. 249: 2554.
52. Cooper, A., and M. Gross. The glutamine transaminase- ω -amidase system in rat and human brain. J. Neurochem. 28: 771.
53. 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.

54. Hersh, L. 1971. Rat liver, ω -amidase. Purification and properties. *Biochem.* 10: 2284.
55. Calderón, J., Morett, E., and J. Mora. 1985. The ω -amidase pathway in the degradation of glutamine in *N. crassa*. *J. Bacteriol.* 161: 807.
56. Calderón, J., and J. Mora. 1985. Glutamine cycling in *N. crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3237.
57. 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.
58. Soberón, M., and A. González. 1987. Glutamine degradation through the ω -amidase pathway in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 9.
59. 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
60. Sikora, L., and G.A. Marzluf. 1984. Regulation of L-amino acid oxidase and D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 183: 33.
61. Kahn, M., Kraus, J., and Somerville. 1985. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In Nitrogen Fixation Research Progress. Eds H.J. Evans, P.J. Bottom and W.E. Newton. Dordrecht, the Netherlands: Martinus Nijhoff. p. 193.
62. Fitzmaurice, A., and F. O'Gara. 1990. Involvement of glutamate as a carbon source in nitrogen-fixing *Rhizobium meliloti*. *Biochem. Society transaction.* p. 358.
63. Segovia, L., Young, P., and E. Martínez. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *J. Bacteriol.* 43: 374.
64. Wade, E. 1980. Synthesis and functions of microbial asparaginase and glutaminases. Payne, W. Ed., *Microorganisms and nitrogen sources.* p. 563.
65. White, C. 1970. The determination of NH_3 with the use of glutamic dehydrogenase. *Methods Enzymol.* 17: 955.
66. Chaney, A., and Marbach, E. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonio. *Clinica Quemesy.* 8:2 130.

67. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol.* 193: 265.
68. Reibach, P.H., Mask, P. and Streeter. 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.* Vo. 27, 491.
69. Durán, S. 1989. La vía de la transaminasa de glutamina- - amidasa en *Rhizobium phaseoli*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
70. 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.
71. Imada, A., Igarasi, S., Nakajama, K., and M. Isono. 1973. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 76: 85.
72. Calderón, J. 1981. Estudio de la transaminasa de Glutamina en *Neurospora crassa*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
73. Cooper, A.J., and A. Meister. 1984. Comparative studies of glutamine transaminase from rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 698: 137.
74. Otami, T.T., and A. Meister. 1957. ω -amide and α -amino acid derivatives of α -ketoglutaric and oxalacetic acids. *J. Biol. Chem.* 224: 137.
75. Mora, J., Encarnación, S., Calderón, J., Gelbard, A.S., and A. Cooper. 1992. Glutamine cycling and the utilization of carbon by different species of *Rhizobium*. Palacios, R., Mora, J., and W. Newton eds. In *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers. p. 556.
76. Katz, J., and R. Rognstand. 1976. Futile cycles in the metabolism of glucose. *Curr. Top. Cell. Reg.* 10: 237.
77. Harder, W., Van Dijken, J.P., and J.A. Roeles. 1981. Microbial growth on C₁ compounds. H. Dalton Ed., Heyden and son Ltd., London. p. 258.