

80
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION PARCIAL DE LA GLUTAMINASA
DE Rhizobium etli

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALEJANDRO HUERTA SAQUERO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D. F.

JULIO DE 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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"PURIFICACION PARCIAL DE LA GLUTAMINASA DE Rhizobium etli"

realizado por ALEJANDRO HUERTA SAQUERO

con número de cuenta 8726586-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. JORGE FERNANDO CALDERON JIMENEZ.

Propietario M. en C. CARLOS CASTILLO POMPEYO.

Propietario M. en C. SOCORRO DURAN VARGAS.

Suplente Dr. JESUS MANUEL LEON CAZARES.

Suplente M. en C. JOSE ESCALANTE

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

**El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la dirección del Doctor Jorge Calderón Jiménez.**

**Durante el desarrollo de este trabajo recibí el apoyo de una beca
otorgada por la FUNDACION UNAM.**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de convertirme en Universitario.

A la Facultad de Ciencias, por su carrera de Biología, donde encontré mi verdadera vocación y el sentido de haber estudiado tantos años.

A mis amigos y compañeros de mil batallas, los vaqueros: Gerardo, Fabián, Fabiancito, Christian, Rafael, Germán y Ernesto, por todas las experiencias que compartimos y que nos únen tan estrechamente.

A Larisa, Tony, Rosaura, América, Bernice y demás amigas de primer semestre; Jesús, José de Jesús, Rivelino, Aristides, Gabriel y Leonel; Javier, Cano, el Amigo, Camacho, Rendón y Flor; Claudia y Rocío; Fernando, Sara y Amelia; Agustín, Salomón, Tere, Panchito, Alvaro y Noé; Vicky, Norma, Bertha, Norma Isabel, Claudia y Verónica; Sandra, Iliana, Lety y Suneeta.

A Sergio, Elizabeth, Lupita y Jorge; Vicky, Norma, Magali, Elsa, Carolina, Alejandra, Irma, Bibiana, Silvia, Josefina y demás amigos y amigas del Universum.

A Corsario, Moy, Pedro, Pablo, Fernando, Juan Pablo, Piolín, Eladio, Angeles, Claudia, Gabriel, Joaquín, Alejandro, Rodolfo y demás camaradas de la Cruz Roja, con quienes aprendí el significado de ser humano.

A Daniel, Ricardo, Miguel, Diana y Silvia; Héctor, Julio, Lorena, Claudia y Erick; a todos mis amigos de la Prepa 2.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio, Socorro, Alejandra, Gisela, Luis, Amaranta y Alejandrino, gracias a todos por su amistad y ese ambiente de trabajo tan agradable.

A mis sinodales, Jesús Manuel León Cázares, Carlos Castillo Pompeyo, Socorro Durán Vargas, Adelfo Escalante Lozada y Jorge Calderón Jiménez.

A Carmen Saquero y Enrique Huerta, los únicos responsables de que me tengan aquí dando lata.

A Chayo, Román, Enrique, Sol, Trini, Cris y Armando, todos Huerta Saquero, esposos y esposas, hijos e hijas, que me dan ese soporte emocional que se necesita.

A Camila y mis ahijados Néstor y Beto.

Dedico este trabajo

A Carmen Saquero Hernández, ejemplo de tenacidad, superación y absoluto amor.

A Jorge Calderón Jiménez, por su confianza, amistad e invaluable ayuda.

A Jesús Manuel León Cázares y Alberto González Escutia, por participar de manera determinante en mi formación profesional y personal.

A mis Susanas: Susy, mi compañera, y Susanita, mi beba.

..." Este es un pequeño paso para la ciencia,
pero representa un gran paso
en mi superación personal ..."

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	4
JUSTIFICACION.....	19
OBJETIVOS.....	20
METODOS.....	21
RESULTADOS.....	39
DISCUSION.....	60
CONCLUSIONES.....	64
PERSPECTIVAS.....	64
REFERENCIAS.....	65

RESUMEN

Rhizobium etli es una bacteria que fija nitrógeno en simbiosis con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol), lo que representa un hecho de gran interés biotecnológico para nuestro país.

La glutamina, producto final de la asimilación de amonio, es un compuesto clave en el metabolismo nitrogenado, ya que sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas, es correpresor del catabolismo nitrogenado, porque su concentración determina la utilización del nitrógeno del medio y la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular.

Las glutaminasas (L-glutamina-amidohidrolasas, EC 3.5.1.2) son enzimas que catalizan la desamidación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio, en relación equimolar.

Los estudios realizados en *R etli* muestran que la glutaminasa juega un papel importante en la utilización de la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y en mantener el balance óptimo de las pozas de glutamina y glutamato intracelular, este hecho es de gran importancia, ya que estos aminoácidos son los donadores universales del nitrógeno celular. La glutaminasa participa en un ciclo donde la glutamina es degradada por esta enzima y sintetizada por la glutamino sintetasa. Se ha encontrado que la mutante LM16 de *R etli*, alterada en la actividad de glutaminasa tiene una actividad de glutaminasa termoestable y que representa sólo un 20 % de actividad en relación a la actividad de la cepa silvestre; mientras que la cepa silvestre tiene un 80% de una actividad de glutaminasa termolábil y un 20% de una actividad de glutaminasa termoestable, la cual presenta además diferente movilidad electroforética respecto a la glutaminasa termolábil, lo que sugiere que existen dos glutaminasas en *R etli*.

En bacteroides de *R etli*, se ha encontrado una actividad enzimática de glutaminasa muy elevada. En bacteroides de la mutante LM16 se presentan pozas altas de glutamina y pozas bajas de glutamato respecto a la cepa silvestre, por lo que se sugiere que la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono puede tener un papel importante en el proceso de la simbiosis, y por ende, en la fijación de nitrógeno.

A pesar de la importancia de las glutaminasas en el metabolismo nitrogenado y del carbono de las Rhizobiáceas, no se han estudiado a profundidad, no se han purificado ni caracterizado, por lo que se decidió llevar a cabo la purificación de las glutaminasas de *R etli*.

Para la purificación de la glutaminasa termolábil se utilizó la cepa silvestre de *R. etli* CE-3 con el plásmido pCD24, que contiene el gen de la glutaminasa termolábil y que presenta tres veces más actividad de glutaminasa que la cepa silvestre; para la purificación de la glutaminasa termoestable, se contó con la mutante LM16 que sólo presenta actividad de la glutaminasa termoestable.

Se determinaron las condiciones que confieren estabilidad a la glutaminasa, las cuales son: alta fuerza iónica para el amortiguador de extracción (0.1 M KH_3PO_4 o más alto), pH 8, presencia de su sustrato (glutamina 5 mM), el agente antioxidante dithiothreitol (DTT, 0.5 mM), presencia de ADP y baja temperatura (4°C). Para los diferentes pasos de purificación, se utilizó amortiguador KH_3PO_4 + 0.5 mM DTT + 5 mM Gln (amortiguador KP), a diferentes molaridades.

Se estableció el siguiente protocolo para la purificación de la glutaminasa termolábil de la cepa CE3pCD24: Precipitación con sulfato de amonio, donde se establecieron cortes a 20 y 35% de saturación. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa, en que se utilizó un gradiente lineal de concentración de amortiguador KP 0.1 M a 1 M para su eluido. Cromatografía de interacción hidrofóbica en Octyl agarosa, en que se utilizó un gradiente lineal de 1 M de KP a H_2O para su eluido. Filtración en gel, en Sephacryl S-200, equilibrado en amortiguador KP 0.2 M. Cibacrón azul, con un gradiente lineal de KP de 0.1 M a 1 M. La glutaminasa termolábil se purificó cercana a la homogeneidad, con una actividad específica de 23 $\mu\text{moles} / \text{mg proteína} \cdot \text{minuto}$. Esta enzima tiene una masa molecular de 90 kDa (obtenido por filtración en gel), con monómeros de 24.5 kDa (obtenido en SDS-PAGE).

Para la glutaminasa termoestable de la cepa LM16 se está estableciendo el protocolo de purificación que hasta ahora sólo incluye sulfato de amonio y DEAE celulosa. Se ha enriquecido aproximadamente 6 veces, con una actividad específica de 100 $\text{nmoles} / \text{mg proteína} \cdot \text{minuto}$.

A partir de la obtención de las glutaminasas puras, se estará en la posibilidad de continuar con su caracterización bioquímica e inmunoquímica, que nos permitan determinar si estas enzimas están sujetas a una regulación alostérica y/o postranscripcional, que controlen su actividad catalítica, ya que actúan en un punto central del metabolismo nitrogenado y de carbono de *R. etli*, para conocer más claramente el papel metabólico que juegan cada una de ellas en *Rhizobium etli*.

INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento indispensable para los organismos vivos, ya que forma parte de los ácidos nucleicos, las proteínas y otros compuestos necesarios para el metabolismo celular. La disponibilidad del nitrógeno, fósforo y potasio en el suelo es de considerable importancia económica, porque son los principales nutrientes de los vegetales. De estos elementos, el nitrógeno es el más susceptible de transformaciones microbianas, y es un nutriente limitante para la agricultura, ya que se encuentra en muy baja proporción en la corteza terrestre, y está principalmente en forma de sales como nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2), compuestos que por su alta solubilidad, son lixiviados por las lluvias hacia estratos profundos, lejos de la zona de penetración radicular, donde difícilmente pueden ser aprovechados por plantas o microorganismos (Du Pont, 1994).

El nitrógeno en forma molecular (N_2) se presenta en la atmósfera en un alto porcentaje, pero resulta ser inerte para la mayoría de los organismos vivos, ya que éstos necesitan obtener el nitrógeno en formas asimilables, tales como nitratos, amonio o aminoácidos. Los microorganismos y las plantas han desarrollado una serie de mecanismos para buscar y asimilar el nitrógeno, los cuales comprenden diferentes procesos, como son la forma de buscarlo, incorporarlo a la célula, metabolizarlo para convertirlo en amonio, asimilarlo a glutamato y glutamina, distribuirlo en otros aminoácidos, acumularlo en orgánulos específicos, sintetizar macromoléculas y finalmente degradar el nitrógeno celular para reciclarlo otra vez a amonio (Mora y Lara, 1988).

EL CICLO DEL NITROGENO

El nitrógeno sufre una serie de transformaciones que incluyen compuestos como las proteínas, sales, o su forma molecular gaseosa, que en su conjunto constituyen el ciclo del nitrógeno; este ciclo puede iniciar con la amonificación y la mineralización del nitrógeno, en donde parte de la gran reserva de compuestos nitrogenados en el suelo (humus) es descompuesta y convertida a amonio y nitratos, que son utilizados por las plantas. La liberación de amonio puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, la primera en el suelo y la segunda en sedimentos de océanos y lagos. El nitrógeno orgánico es mineralizado por organismos heterotróficos, principalmente bacterias amonificantes y hongos. La

producción bacteriana atrae a organismos que se alimentan de bacterias, entre los cuales prevalecen los protozoarios por su efectividad (Elliot y Coleman, 1977). Cuando la bacteria es consumida, parte del nitrógeno bacteriano es excretado como amonio y este puede ser tomado por las raíces de las plantas o ser transformado a nitratos por otras bacterias (Sprent, 1987).

Ya en forma de amonio o nitratos, el nitrógeno es asimilado a proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados, proceso denominado **inmovilización o asimilación**. La mayoría de las moléculas que la célula puede sintetizar, también las puede catabolizar, ya que todas las moléculas están sujetas a un reciclaje celular. La falta de nitrógeno es una señal metabólica para activar el reciclaje, por lo que la falta de éste lleva a los organismos a degradar ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, pared celular y aminoazúcares (Alexander, 1981).

La oxidación biológica del amoníaco a nitritos y nitratos recibe el nombre de **nitrificación**, y es llevada a cabo por microorganismos nitrificantes. La nitrificación autotrófica es desarrollada por bacterias gram negativas de la familia *Nitrobacteriaceae*, todos los organismos de esta familia son capaces de obtener sus requerimientos energéticos para su crecimiento de la oxidación de amonio a nitritos. Las bacterias nitrificantes pueden dividirse en dos grupos principales: las que oxidan el amonio a nitritos y las que oxidan nitritos a nitratos. Las *Nitrosomonas* son los microorganismos representativos que oxidan amonio a nitritos. La serie subsecuente de reacciones que conducen a nitratos son desarrolladas principalmente en el medio por la bacteria autotrófica *Nitrobacter* (Belser, 1979).

En el proceso siguiente del ciclo del nitrógeno, la **desnitrificación** se lleva a cabo por bacterias como *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Thiobacillus*, que reducen los nitratos y nitritos a monóxido de nitrógeno (NO) y a nitrógeno molecular (N₂) liberándolo a la atmósfera, lo que trae consigo una pérdida neta del nitrógeno de los suelos. Los principales factores ambientales que afectan el proceso de desnitrificación son la cantidad y naturaleza de la materia orgánica, la aereación, la humedad, la acidez y la temperatura. Es por eso que las bacterias desnitrificantes comúnmente se encuentran en el abono, en el suelo fértil y en plantas de tratamiento de aguas residuales. Estas bacterias son anaerobias facultativas, en las que la desnitrificación es un mecanismo respiratorio en el que el nitrato sustituye al oxígeno (Alexander, 1981).

Se ha calculado que las pérdidas de nitrógeno debidas a la desnitrificación son compensadas por el nitrógeno atmosférico que es reducido a amonio por las bacterias

fijadoras de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno compensan estas pérdidas reduciendo el nitrógeno atmosférico a amonio. La fijación de nitrógeno es llevada a cabo por bacterias en vida libre o en simbiosis, las que aportan el 95 % de la conversión de nitrógeno molecular a formas combinadas como amonio; el 5 % restante es fijado como resultado de procesos abióticos por medio del efecto de descargas eléctricas, luz ultravioleta, procesos industriales, etc. Con la fijación biológica del nitrógeno, se completa el ciclo del nitrógeno. (Du Pont, 1994; Calderón et al, 1994).

ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

Dentro de los organismos capaces de realizar fijación de nitrógeno se pueden distinguir dos grupos: los organismos que fijan en vida libre, como los microorganismos de los géneros *Azotobacter*, *Anabaena*, *Klebsiella* y *Clostridium*, que fijan nitrógeno para satisfacer sus propios requerimientos, esto sólo contribuye con una quinta parte del nitrógeno total fijado por los organismos.

El segundo grupo lo constituyen microorganismos que establecen relaciones mutualistas con las raíces de las plantas, principalmente leguminosas, y pueden fijar nitrógeno durante esta asociación, que representa un 80 % del total de nitrógeno fijado biológicamente. Dentro de los fijadores simbióticos de nitrógeno pueden citarse especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*. Desde el punto de vista económico, en relación a la agricultura, la fijación simbiótica de nitrógeno es la más importante porque el nitrógeno fijado es suministrado directamente a la raíz de la planta, lo que garantiza su aprovechamiento.

La escasez de nitrógeno disponible en el suelo en forma de compuestos asimilables por las plantas, es uno de los factores limitantes para la agricultura. Por ello, se ha recurrido al uso de fertilizantes químicos, obtenidos mediante el proceso de Haber-Bosch, en el que se reduce el nitrógeno atmosférico a amonio, con un gran gasto energético, ya que se requiere de elevada presión y temperatura para que sea eficiente. Los fertilizantes químicos presentan serios inconvenientes tanto económicos como ecológicos: requieren de una industria desarrollada, cuesta mucho desde el punto de vista energético, poseen elevados precios de transporte, contaminan el medio durante su producción, sólo parte del nitrógeno agregado a los campos se recupera en el cultivo, ya que parte del nitrógeno se oxida a nitratos y éste se pierde tanto por lixiviación como por desnitrificación. Otro problema grave es que parte del

nitrógeno es oxidado a nitratos y éstos pueden contaminar lagos, causando eutroficación, es decir, la gradual muerte de los sistemas lacustres. Además el nitrato es un compuesto potencialmente carcinogénico, ya que se puede convertir a nitrito y reaccionar con aminas secundarias para dar nitrosaminas, que son compuestos que pueden inducir mutaciones.

Al considerando el alto costo económico que representa el uso de fertilizantes nitrogenados, así como las desventajas ecológicas que conlleva, se ha pensado en la fijación simbiótica de nitrógeno como una alternativa biotecnológica para fertilizar los suelos, por lo tanto, el estudio del metabolismo de bacterias fijadoras de nitrógeno como las del género *Rhizobium*, es de una prioridad por demás justificable (Du Pont, 1995, Durán, 1994).

Los miembros del género *Rhizobium* son bacterias gram-negativas aerobias en forma de bacilos de 0.5 a 0.9 μm de ancho y de 1.2 a 3 μm de largo. El género se subdivide en dos tipos de especies: los *Rhizobium* de crecimiento rápido que tienen un tiempo de duplicación de 2 a 4 horas y forman colonias de entre 2 y 4 mm de diámetro en 3 a 5 días; y los *Rhizobium* de crecimiento lento que tienen un tiempo de generación de 6 a 8 horas y forman colonias de 1 mm después de 7 a 10 días de incubación. El término Rhizobia es aplicado a las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium*. Estas bacterias se han clasificado por la especie de planta con que interactúan, que en general, es específica; por su velocidad de crecimiento, su metabolismo y la forma en que hibridiza el DNA entre ellas. Estas características se comparan mediante taxonomía numérica (Tabla 1) (Segovia et al, 1993; Du Pont, 1994).

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

Durante la simbiosis ocurre un intercambio metabólico en el que la bacteria aporta el nitrógeno en formas asimilables para las leguminosas, y éstas proporcionan esqueletos de carbono necesarios para el metabolismo de la bacteria, que a su vez son limitantes para la fijación de nitrógeno, que requiere mucha energía.

La familia *Leguminosae* es la segunda que provee al hombre más semillas como alimento, se destaca por el elevado número de especies útiles y la variedad de productos que suministra a la economía humana. Comprende pocas especies nocivas o invasoras. (Rodríguez y Porras, 1985; Esau, 1987; Cronquist, 1981).

El frijol (*Phaseolus vulgaris*), que pertenece a ésta familia, es un cultivo básico para los pequeños agricultores en muchos países de América y África tropical y juega un papel crítico

en la nutrición de las familias con escasos recursos, ya que en algunos casos, proporciona hasta una tercera parte del total de la proteína consumida (CIAT, 1987).

Tabla 1. Clasificación de los Rhizobia y preferencia de hospedero.

Género	Especie	Biovariedad	Hospedero
Crecimiento rápido <i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	<i>phaseoli</i>	frijol
		<i>trifoli</i>	trébol
		<i>viceae</i>	chicharo
	<i>etli</i>		frijol
	<i>meliloti</i>		alfalfa
	<i>loti</i>		loto
	<i>lupini</i>		lupinus
Crecimiento lento	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>fredii</i>	leucaena medicago
		<i>tropici</i>	frijol, leucaena siratro
	<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	soya, leucaena mimosa
	<i>Bradyrhizobium</i>	spp	sesbania parasponia

Tomado de Du Pont, 1994.

Hay leguminosas que se cultivan para grano comestible: chicharo, frijol, haba, lenteja, soya, cacahuate, etc. También se cultivan para el consumo de aceites (como la soya y cacahuate), y se consumen secas por su alto contenido proteico (Stanley y Aguilera, 1985). Se utilizan para forraje y como abono verde: alfalfa, trébol, carretilla, cacahuate, haba, soya y lenteja.

La especificidad de las interrelaciones entre los simbioses Rhizobia-leguminosa incluye mecanismos bioquímicos de reconocimiento, intercambio de señales moleculares entre el

hospedero y la bacteria, ya que durante la simbiosis ocurren cambios en sus procesos metabólicos, que a continuación se describen.

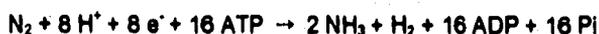
EL PROCESO DE NODULACION

La fijación de nitrógeno ocurre en una estructura llamada nódulo, que se desarrolla en una serie de pasos. En el proceso de nodulación *Rhizobium* es quimiotácticamente atraído hacia las raíces de la planta debido a atrayentes específicos exudados que contienen compuestos flavonoides. Las células vegetales susceptibles de infección y nodulación, se encuentran entre el pelo radicular más pequeño y el ápice de la raíz. Las bacterias inician la síntesis de un tetrasacárido acetilado que altera el crecimiento de los pelos de la raíz y provoca su deformación e incluso su crecimiento en espiral, que atrapa a las bacterias (Dazzo y Gardiol, 1984; Yao y Vincent, 1969).

Las células de la corteza de la raíz bajo la epidermis, empiezan a dividirse (Libbenga y Harkes, 1973; Newcomb, 1981) y las bacterias atrapadas en la espiral de los pelos de la raíz o entre los pelos y otra célula, proliferan y empiezan a infectar a las células superficiales de la planta. Las células de la planta invadida son estimuladas a producir una envoltura de pared celular llamada "hilo de infección" (Callaham y Torrey, 1981), por donde penetran las bacterias al tiempo que se reproducen. Las células de la raíz van formando el cuerpo del nódulo al dividirse y los hilos de infección se ramifican; cuando las bacterias son liberadas en el citoplasma de las células de la raíz, son envueltas en la membrana plasmática de la planta llamada membrana peribacteroidal (Robertson et al, 1978). En este momento, las bacterias dejan de crecer, se diferencian a bacteroides y empieza la fijación de nitrógeno y el intercambio metabólico (Sutton et al, 1981; Verma y Long, 1983).

EL PROCESO DE FIJACION

La nitrogenasa es el complejo enzimático que cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico en amonio, está formada por dos proteínas que no pueden fijar por separado, llamadas proteína Fe Mo y proteína Fe. El proceso de fijación requiere de gran cantidad de energía para que cada molécula de N_2 sea convertida a dos moléculas de NH_3 (Burgess, 1985).



La proteína grande (proteína Fe Mo) es un tetrámero con dos pares de subunidades no idénticas ($\alpha_2 \beta_2$) con una masa molecular aproximada entre 220 y 240 kDa. La proteína pequeña (proteína Fe) es un dímero de subunidades idénticas (α_2) con una masa molecular aproximada entre 60 y 65 kDa. Todas las nitrogenasas tienen una estructura básica general (Mortenson y Thomely, 1979).

LA ASIMILACION DE AMONIO

Una vez que el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio, éste es incorporado a compuestos orgánicos por el proceso conocido como asimilación de amonio, a través del cual se deriva todo el nitrógeno celular, y que consiste en la incorporación del nitrógeno inorgánico a esqueletos de carbono para formar los aminoácidos glutamato y glutamina, que a su vez son los donadores universales del nitrógeno necesario para la biosíntesis de todos los compuestos nitrogenados y de su equilibrio depende la eficiente distribución del nitrógeno intracelular.

Existen evidencias que indican que la asimilación de amonio se lleva a cabo principalmente por la planta (Brown y Dilworth, 1975; O'Gara y Shanmugan, 1976). Así, las enzimas para la asimilación del amonio se encuentran bajas en el bacteroide, mientras que en el citoplasma de las células de la planta se encuentran muy altas. En el citoplasma de la planta el nitrógeno se encuentra principalmente como glutamina, glutamato, alanina y alantoína; mientras que en los bacteroides los compuestos nitrogenados más abundantes son glutamina, glutamato, alanina y aspartato.

La glutamina, uno de los productos finales de la asimilación del amonio, es un compuesto clave en el metabolismo nitrogenado, ya que sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas (Stadtman, 1973) y además funciona como correpressor del catabolismo nitrogenado en muchos microorganismos (Halpern, 1988), ya que su concentración determina la utilización del nitrógeno del medio y la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular (Figura 1).

Junto con el glutamato, la glutamina es considerada como donador universal del nitrógeno celular, y de el equilibrio entre ambos, depende la óptima distribución del nitrógeno celular.

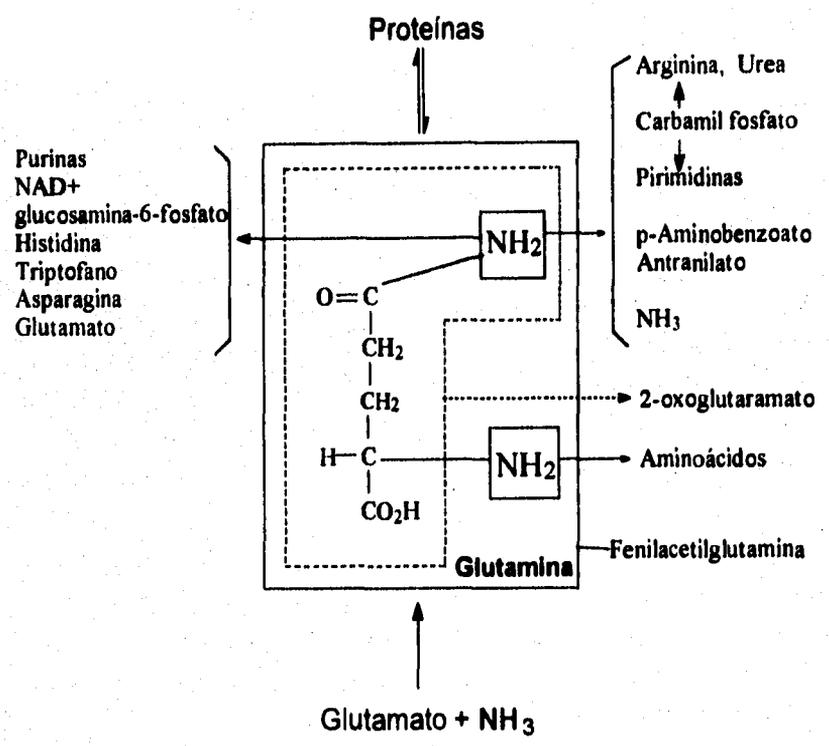


Figura 1. Glutamina y glutamato como donadores de nitrógeno.

EL METABOLISMO DE CARBONO

En la simbiosis entre la leguminosa y *Rhizobium* la bacteria proporciona amonio, el cual es utilizado por la planta y la planta provee a la bacteria de carbono. La naturaleza de la fuente de carbono que provee la planta ha sido sumamente estudiada, debido a que el abastecimiento de la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno (Hardy y Havelka, 1976).

Los compuestos de carbono que son liberados al nódulo son primariamente monosacáridos y disacáridos, sin embargo, algunos estudios sugieren que estos compuestos no son la fuente primaria del carbono que utilizan los bacteroides (Dilworth y Glenn, 1984), ya

que éstos carecen de la actividad de invertasa, presentan bajos niveles de las enzimas de la glucólisis y oxidan muy lentamente los azúcares.

El ciclo de los ácidos tricarbóxicos ha sido reconocido como una vía central en el metabolismo de carbono en los bacteroides (Stowers, 1985), así, los niveles de las enzimas que participan en éste ciclo se encuentran elevadas en los bacteroides (McKay et al, 1989) y las mutantes deficientes en enzimas de este ciclo, tales como la succinato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, forman nódulos inefectivos, es decir que no fijan nitrógeno (Duncan y Fraenkel, 1979; Gardiol et al, 1982); mientras que las mutantes deficientes en el metabolismo de carbohidratos forman nódulos efectivos. Los intermediarios del ciclo de Krebs, succinato, fumarato y malato son considerados la fuente más probable de carbono y energía utilizada por los bacteroides, ya que las mutantes deficientes en el transporte de ácidos dicarbóxicos no fijan nitrógeno (Arwas et al, 1985; Finan et al, 1983; Ronson et al, 1981; Ronson y Primrose, 1979).

Aunque la evidencia existente indica que los ácidos dicarbóxicos son la fuente de carbono que le proporciona la planta a los bacteroides durante la fijación de nitrógeno, las mutantes que no transportan estos compuestos son capaces de nodular, lo que sugiere que existen otras fuentes de carbono que proporciona la planta a *Rhizobium* durante la simbiosis. Kahn y colaboradores (1985) han propuesto que los compuestos carbonados que contienen nitrógeno podrían ser también importantes fuentes de carbono. En este modelo, se propone que al acoplar el metabolismo de la simbiosis a través del intercambio de compuestos que contengan nitrógeno (como la glutamina) se da lugar a una relación evolutivamente más estable.

Las mutantes de *Rhizobium meliloti* alteradas en el catabolismo del aspartato nodulan pero no fijan nitrógeno. Dichas mutantes presentan bajos niveles de actividad de aspartato aminotransferasa, no crecen en aspartato como fuente de carbono y forman nódulos inefectivos, lo que demuestra que dicha actividad se requiere para la fijación de nitrógeno, e identifica al aspartato como sustrato esencial de los bacteroides (Rastogi y Watson, 1991).

Recientemente se ha obtenido una triple mutante de GS (sin actividad de glutamino sintetasas) de *Rhizobium meliloti*, la cual no crece en medios sin glutamina, pero sí tiene la capacidad de nodular y fijar nitrógeno, lo que sugiere fuertemente que durante la simbiosis, la planta le proporciona este aminoácido al bacteroide. (Calderón, 1995, comunicación personal).

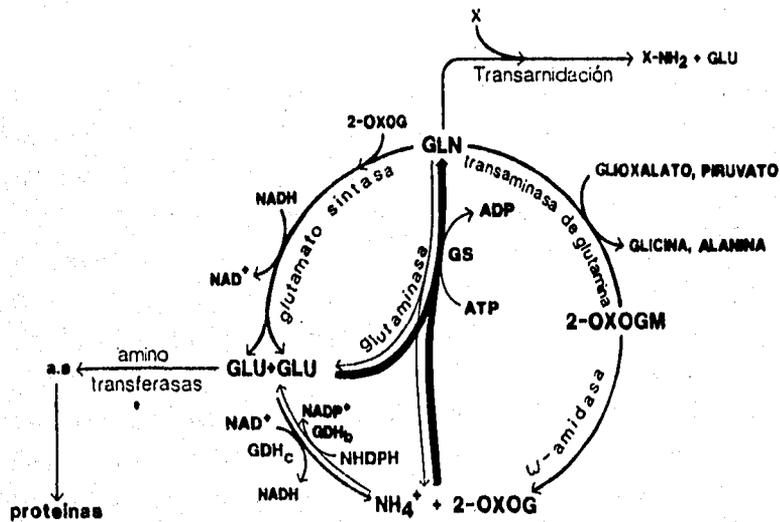
LA ASIMILACION DE LA GLUTAMINA EN *Rhizobium etli*

Por medio de estudios bioquímicos y fisiológicos se han determinado las enzimas que participan en la asimilación del amonio y la degradación de la glutamina en *R etli* (Figura 2); se ha encontrado que el amonio es asimilado por la vía glutamino sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT), y la glutamina es sintetizada a partir de glutamato y amonio, por medio de la GS, con gasto de ATP y degradada a través de la transaminasa de glutamina - ω - amidasa, y a través de la glutaminasa (Durán y Calderón, 1995).

Rhizobium etli presenta tres glutamino sintetetasas, denominadas GSI, GSII, y GSIII. La GSI es homóloga al producto del gen *glnA* de las bacterias entéricas en términos de termoestabilidad, peso molecular, subunidades de la enzima y propiedades de adenilación. La GSII está compuesta por ocho unidades, es termolábil y no está sujeta al control por adenilación. La actividad de GSI es regulada postranscripcionalmente, pero los niveles de la enzima permanecen relativamente constantes en diversas condiciones. La actividad de GSII es regulada por la fuente de nitrógeno, y es reprimida en amonio y glutamina como fuentes de nitrógeno, y activada por glutamato o nitrato. La GSII también se regula por la concentración de oxígeno (Bravo y Mora, 1988). La GSIII actualmente está siendo caracterizada.

La glutamato sintasa utiliza glutamina y 2-oxoglutarato para sintetizar dos moléculas de glutamato. La GOGAT puede tener un papel en la regulación del equilibrio de la glutamina y del glutamato intracelular. Es reprimida por glutamato e inhibida por ácidos orgánicos (Bravo y Mora, 1988).

La transaminasa de glutamina transfiere el amino de la glutamina a un 2-oxoácido, para formar el correspondiente α -aminoácido y 2-oxoglutarato. Esta transaminasa es reversible, pero debido a que se encuentra acoplada a la ω -amidasa, la cual utiliza como sustrato el 2-oxoglutarato para formar 2-oxoglutarato y amonio, la vía opera en el sentido de utilización de la glutamina; por lo que se sugiere que la transaminasa de glutamina - ω - amidasa es importante para la síntesis irreversible de glicina, alanina y otros aminoácidos, así como para mantener el balance entre los mismos (Durán y Calderón, 1995).

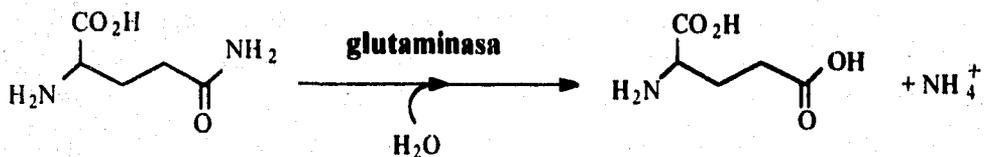


GLN: glutamina, GLU: glutamato a.a: aminoácido GS: glutamino sintetasa
 NH₄⁺: amonio GDH_b: glutamato dehidrogenasa biosintética 2-oxog: 2-oxoglutarato
 GDH_c: glutamato dehidrogenasa catabólica 2-OXOGM: 2-oxoglutaramato

Figura 2. La asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*.

LA GLUTAMINASA DE *Rhizobium etli*

Las glutaminasas (L-glutamina-amidohidrolasas, EC 3.5.1.2) son enzimas que catalizan la desamidación hidrolítica de la glutamina y dan como productos glutamato y amonio:



Durán y Calderón (1995) reportaron por primera vez la presencia de glutaminasa en *R. etli*. La actividad de glutaminasa es regulada por la presencia de su sustrato, así como por amonio y la fuente de carbono; además varía en las diferentes fases de crecimiento de *R. etli*, encontrándose alta durante la fase exponencial de crecimiento, independientemente de la fuente de nitrógeno y carbono utilizada para su crecimiento, mientras que durante la fase estacionaria, la actividad de glutaminasa baja en la mayoría de las condiciones de crecimiento, exceptuando glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, y glutamina-succínico, lo que sugiere que la glutamina es inductor de la enzima.

Los estudios realizados en *R. etli* demuestran que la glutaminasa juega un papel importante en la utilización de la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y en mantener el balance óptimo de las pozas de glutamina y glutamato intracelular. Una mutante alterada en la actividad de glutaminasa (LM16), no puede crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, además de que presenta alta la poza de glutamina intracelular y baja la poza de glutamato, respecto a la cepa silvestre (Durán et al, en prensa).

La glutaminasa participa en un ciclo donde la glutamina es degradada por esta enzima y sintetizada por la glutamino sintetasa: Cuando la bacteria crece en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, excreta altas cantidades de amonio en relación a su crecimiento en glutamina-succínico; la glutaminasa presenta una actividad similar en esas condiciones, mientras que la actividad de glutamino sintetasa se encuentra reprimida cuando la bacteria crece en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y se encuentra activa en glutamina-succínico. Al utilizar un inhibidor de GS, cuando la bacteria crece en glutamina-succínico, se observa que la excreción de amonio es varias veces mayor, lo que indica que el amonio liberado por la glutamina es asimilado por la GS, lo que da lugar a la operación del ciclo de degradación y síntesis de la glutamina (Durán y Calderón, 1995).

El patrón de actividad de la glutaminasa presenta correlación con la actividad de GSII, durante el crecimiento, excepto cuando la bacteria crece en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, ya que en esta condición el ciclaje de la glutamina opera a un nivel más bajo, lo que permite que la glutamina sea utilizada como fuente de carbono para el crecimiento.

Se han propuesto muchas funciones se para el ciclaje de la glutamina (Calderón, et al, 1989; Calderón y Mora, 1985; Katz y Rognstad, 1976; Mora et al, 1992; Mora, 1990): contribuir a la transaminación irreversible de la glutamina; control rápido y eficiente de la concentración intracelular de la glutamina y de la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular; un método general para tomar o liberar los esqueletos de carbono de los metabolitos

nitrogenados; mantener un balance óptimo entre los compuestos nitrogenados; para disipar energía; y contribuir a un gasto energético, de ATP y poder reductor, para una oxidación óptima de carbono en el ciclo de Krebs y con ello generar más energía.

En bacteroides de la mutante de *R. etli*, LM16, afectada en la actividad de glutaminasa, se presentan altas pozas de glutamina y bajas de glutamato respecto a la cepa silvestre, por lo que se sugiere que la degradación de la glutamina a esqueletos de carbono puede tener un papel importante en el proceso de la simbiosis, y por ende, en la fijación biológica del nitrógeno (Durán et al, 1995, en prensa).

Algunos estudios recientes en nuestro laboratorio demuestran que la mutante LM16 presenta una actividad de glutaminasa termoestable, mientras que la cepa silvestre presenta un 80 % de una actividad de glutaminasa termolábil y un 20 % de una actividad de glutaminasa termoestable, lo que sugiere que existen dos glutaminasas en *R. etli*. (Ver resultados en precipitación diferencial de proteínas por su termoestabilidad).

LA GLUTAMINASA EN OTROS MODELOS BIOLÓGICOS.

GLUTAMINASAS DE MAMÍFEROS.

En mamíferos se han purificado y caracterizado bioquímicamente e inmunológicamente dos isoenzimas de glutaminasa que presentan variación en cuanto a su distribución en el organismo, así como en su regulación:

La L-glutaminasa (glutaminasa de hígado), se encuentra únicamente en hígado de adultos, se caracteriza por una Km relativamente alta glutamina y una Ka baja por fosfato por lo que es conocida como fosfato-independiente, se activa por amonio y no es inhibida por glutamato.

La K-glutaminasa (glutaminasa de riñón), se encuentra en todos los tejidos que tienen actividad de glutaminasa (riñón, cerebro, músculo, intestino delgado, tejidos fetales), presenta una Km relativamente baja por glutamina, una Ka alta por fosfato (fosfato dependiente) y presenta inhibición por glutamato (Smith y Watford, 1988; Curthoys et al, 1976). Asimismo se plantea la existencia de una regulación postranscripcional de la actividad de glutaminasa durante el desarrollo de tumores. (Márquez et al, 1994).

El aislamiento y caracterización del DNA complementario de las dos isoenzimas muestra un 80 % de homología entre sus secuencias (Shapiro y Curthoys, 1987; Shapiro, 1991; Smith y Watford, 1990); también difieren marcadamente en tamaño, ya que la L-glutaminasa presenta una masa molecular de 300 kDa, con monómeros de 58 kDa; mientras que la K-glutaminasa presenta una masa molecular de 190 kDa.

Se ha propuesto que las glutaminasas en los diferentes tejidos presentan importancia capital para regular las concentraciones de glutamina, glutamato y amonio (Smith y Watford, 1988; Heini et al, 1987; Curthoys et al, 1976; Nissim et al, 1992; Nelson et al, 1992; Swierczynski et al, 1993; Márquez et al, 1994; Pinkus y Windmueller, 1977). Las bajas concentraciones de amonio en el cerebro presentan una alta toxicidad, por lo que la glutaminasa presenta mecanismos regulatorios muy sensibles en ese tejido (Bradford y Ward, 1976); en riñón, el pH se regula a través de las concentraciones de amonio, en casos de acidosis, la glutaminasa se activa y regula inmediatamente el pH; se le atribuye un papel central en la ureagénesis; en el intestino delgado, músculo esquelético y cardíaco, así como en el desarrollo de tumores, se ha propuesto que la degradación de la glutamina por la glutaminasa es importante para utilizarla como fuente de carbono (Curthoys et al, 1976; Nissim et al, 1992; Nelson et al, 1992; Swierczynski et al, 1993; Márquez et al, 1994).

GLUTAMINASAS DE *Escherichia coli*

En *E coli* se encuentran dos isoenzimas de glutaminasa: La glutaminasa A, inducible, que presenta un pH óptimo de 5, es regulada por AMP cíclico y metabolitos nitrogenados, y que presenta una masa molecular de 110 kDa (Hartman y McGrath, 1973); y la glutaminasa B, constitutiva y regulada alostéricamente por nucleótidos de adenina, cationes divalentes y ácidos carboxílicos, activa a pH 7 y con una masa molecular de 90 kDa.

Los niveles de glutaminasa A varían dependiendo de las condiciones nutricionales y estadio de crecimiento de la bacteria, se incrementa en la fase exponencial tardía de crecimiento, cuando la bacteria crece en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

Los niveles de glutaminasa B no varían en diferentes condiciones ni fases de crecimiento.

Los controles recíprocos para la glutaminasa B y la glutamino sintetasa de *E. coli* no permiten su acoplamiento para el establecimiento de un ciclo de síntesis y degradación de la

glutamina, ya que la enzima biosintética es regulada por sus productos finales, mientras que la glutaminasa B es inhibida por nucleótidos tri y di fosfatados y activada por nucleótidos monofosfatados (Prusiner, 1973).

GLUTAMINASAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura también presenta dos isoenzimas de glutaminasa, una periplásmica, la glutaminasa A, termoestable, con pH óptimo de 7.5; y una citoplásmica, la glutaminasa B, termosensible, con pH óptimo de 8.1 (Soberón y González, 1987).

La glutaminasa B se modula negativamente por algunos 2-oxo ácidos y es inhibida *in vivo* por piruvato. Se les atribuye el control de la concentración de glutamina intracelular.

GLUTAMINASAS DE *Bacillus licheniformis*

Se han reportado dos isoenzimas de glutaminasa en extractos crudos de *B licheniformis*:

Una glutaminasa con pH óptimo de 7, constitutiva, que corresponde a la glutaminasa B de *E coli*, a la cual se le ha propuesto la función de catabolizar la glutamina durante la fase exponencial de crecimiento, cuando este microorganismo es crecido en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

La otra glutaminasa presenta un pH óptimo de 9, es inducible y corresponde a la glutaminasa A de *E coli*, la cual parece ser responsable de eliminar el contenido intracelular de glutamina durante la fase exponencial tardía. Es inducida por glutamina y presenta represión catabólica por carbono, especialmente por glucosa. Se ha propuesto la posibilidad de la existencia de un ciclo de síntesis y degradación de la glutamina entre la GS y la glutaminasa inducible de *B licheniformis* (William, et al, 1981).

GLUTAMINASA DE *Rhizobium lupini*

Se ha determinado la presencia de actividad de glutaminasa en bacteroides intactos de *R lupini*. Dicha glutaminasa presenta una alta actividad (2.4 $\mu\text{mol}/\text{mgp}\cdot\text{h}$), un pH óptimo entre 7.8 y 8, y saturación a 36 mM de glutamina con $K_{m_{app}}$ de 7.5 mM

La actividad de glutaminasa en bacteroides se incrementa en proporción al desarrollo de las plantas, así como a la presencia de iones Cl^- .

En los bacteroides ocurre la fijación de nitrógeno a amonio, la asimilación de éste a glutamato y glutamina se lleva a cabo principalmente en la planta; y una intensa hidrólisis de glutamina en el bacteroide puede ser el primer paso para la síntesis de asparagina, la cual constituye el principal compuesto de transporte de nitrógeno de los nódulos hacia el resto de la planta (Kretovich, et al, 1982 y 1985).

JUSTIFICACION

A pesar de la importancia de las glutaminasas en el metabolismo nitrogenado y en la interacción de éste con el metabolismo del carbono en las Rhizobiáceas, especialmente en *Rhizobium elli*, donde se ha comprobado que la actividad enzimática de glutaminasa es necesaria para que la bacteria pueda utilizar a la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y para regular las pozas intracelulares de los donadores universales del nitrógeno celular (glutamina y glutamato), además de la probable presencia de un par de isoenzimas de glutaminasa en *R elli* y la posibilidad de que durante la simbiosis la planta proporcione al bacteroide glutamina como fuente de carbono, que sugiere que la actividad de glutaminasa tiene un papel importante durante esta relación mutualista, las glutaminasas no se han estudiado a profundidad, no se han purificado ni caracterizado bioquímicamente, por lo que decidimos iniciar los estudios relativos a estas enzimas, con su purificación.

Por tanto, el estudio y la caracterización de las isoenzimas de glutaminasa en *R elli*, de sus condiciones de operatividad y mecanismos regulatorios, permitirán establecer con mayor claridad el papel metabólico de cada una de ellas y el efecto que tendría la modificación de esos mecanismos reguladores en la fisiología de la bacteria, así como sus semejanzas y diferencias.

OBJETIVOS

Establecer las condiciones que confieren estabilidad a la actividad enzimática de glutaminasa de *R. etli*.

Establecer un protocolo de purificación de las glutaminasas de *R. etli*.

La necesidad de establecer las condiciones que confieren estabilidad a las glutaminasas reside en el hecho de que durante el proceso de purificación de las mismas, las condiciones intracelulares en que se encontraban originalmente van a sufrir un cambio radical, por lo que se requiere estandarizar al máximo las condiciones y los compuestos que se incluirán para proporcionar estabilidad a las enzimas durante todo el proceso de purificación.

El establecimiento de un protocolo de purificación de las glutaminasas permitirá obtenerlas a mayor escala, a fin de continuar con su caracterización bioquímica e inmunoquímica.

MÉTODOS

CEPAS

Las cepas de *Rhizobium etli* utilizadas en este trabajo son:

La cepa silvestre CE3, con resistencia al ácido nalidixico y estreptomina (Noel, 1984).

La cepa CE3pCD24, con resistencia al ácido nalidixico y tetraciclina. (datos no publicados), que presenta una mayor actividad de glutaminasa en relación a la cepa silvestre, debido a que tiene el plásmido pCD24 que codifica para la glutaminasa termolábil.

La cepa mutante LM16, con resistencia al ácido nalidixico y kanamicina, mutante obtenido por la inserción del transposón TN5 de manera aleatoria, y seleccionada por su incapacidad para crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno, así como por una muy baja actividad de glutaminasa (Durán et al, 1995, en prensa).

MEDIOS DE CULTIVO

PY

El medio rico de crecimiento para las cepas de *Rhizobium etli* es PY (peptone-yeast) (Beringer, 1974).

Peptona de caseína	0.5%
Extracto de levadura	0.3%
CaCl ₂	7.0 mM
Agar (sólo para medio sólido)	1.5%

Para el medio sólido se agrega el agar al matraz, se esteriliza a 110 °C durante 15 minutos. El pH del PY es de 6.8.

La solución de CaCl₂ se prepara por separado a una concentración 100x y se esteriliza en autoclave, se agrega hasta que el medio se encuentre tibio.

LB

El medio rico utilizado para control de contaminación de otras bacterias en nuestros medios de cultivo es LB (Luria-Bertani broth) (Miller, 1972), ya que es un medio rico en donde crece la gran mayoría de bacterias, hongos y levaduras, mientras que *Rhizobium etli* no crece.

El medio Luria-Bertani está compuesto por:

Peptona de caseína	1.0%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1.0%
Agar (sólo para medio sólido)	1.5%

Para el medio sólido se agrega la cantidad indicada de agar en cada matraz, se esteriliza en autoclave. El pH del medio es de 7.

MM

El medio mínimo utilizado para el crecimiento de las cepas CE3pCD24 y LM16, está compuesto de:

K ₂ HPO ₄	1.2 mM
MgSO ₄	0.8 mM
Acido succínico	10.0 mM
Glutamina	10.0 mM
CaCl ₂	1.5 mM
FeCl ₃	0.0005%

Se utilizó el ácido succínico como fuente de carbono y la glutamina como fuente de nitrógeno, la cual se agrega al medio mínimo cuando éste ya fue esterilizado en autoclave y se encuentra tibio. La glutamina se esteriliza por filtración.

El CaCl₂ se prepara a una concentración 100x y se esteriliza en autoclave por separado, se agrega al medio antes de usarse.

El FeCl₃ se prepara a una concentración 1000x y se esteriliza por filtración, se agrega al medio antes de usarse.

El pH del medio mínimo es de 6.8.

ANTIBIOTICOS

Los antibióticos utilizados para el crecimiento de la cepa de interés, son los siguientes:

Acido nalidixico	(Nal)	20 µg/ml
Tetraciclina	(Tc)	10 µg/ml

Los antibióticos se agregan al medio líquido antes de inocularse y al medio sólido cuando éste ya está tibio, antes de vaciarlo a las cajas petri.

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Lowry (Lowry, et al, 1951) modificado para volúmenes pequeños:

Solución A.

NaOH 0.1N

Na₂CO₃·2H₂O 2%

Solución B.

KNaC₄H₄O₆·4H₂O 2%

Solución C.

CuSO₄·5H₂O 1%

Estas soluciones se preparan con anticipación y se almacenan a 4°C.

Previo a la cuantificación de proteína, se prepara la solución ABC de la manera siguiente:

Solución A	98%	
Solución B	1%	Agitar.
Solución C	1%	Agitar.

Es necesario mezclar las soluciones siempre en el orden indicado a fin de evitar precipitaciones.

Se prepara la solución Fenol folin mezclando una parte de Folin-Ciocalteu con dos partes de agua destilada.

Proteína estandar:

Se prepara una solución de albúmina sérica bovina 400 µg/ml en alícuotas de 1 ml que se almacenan a -20°C.

Para la cuantificación de proteína de los extractos, se procede de la manera siguiente:

A un eppendorf se le agregan 196 μ l de agua destilada , 4 μ l de extracto concentrado y se agita en vortex.

Para extractos diluidos o con poca proteina, es necesario preparar los tubos de reacción con las siguientes cantidades: 180 μ l de agua + 20 μ l de extracto.

Al mismo tiempo en que se corren las reacciones de los extractos, es necesario preparar un estandar de la manera siguiente: 100 μ l de agua + 100 μ l del estandar de albúmina. Se agita.

También se prepara un blanco con 200 μ l de agua destilada.

En seguida se agrega a las muestras, el estandar y el blanco, 1 ml de solución ABC , se agita y se deja incubando durante 10 minutos.

Finalmente se agregan 100 μ l de solución Fenol folin. Se agita y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lee a 625 nm contra el blanco.

De las lecturas obtenidas, se calcula la cantidad de proteina mediante la siguiente fórmula:

$$200 \mu\text{g de albúmina} \rightarrow 0.5 \text{ DO}_{625\text{nm}}$$

$$\mu\text{g del extracto} = (\text{DO}_{625\text{nm}} \text{ del extracto} \times 200 \mu\text{g}) / 0.5 \text{ DO}_{625\text{nm}}$$

El resultado que se obtiene se divide entre los μ l de extracto utilizados para la determinación para así obtener $\mu\text{gP} / \mu\text{l}$ de extracto.

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE BRADFORD

El método de Bradford para la determinación de proteina (Bradford, 1976), se llevó a cabo de la manera siguiente:

Reactivos:

Albúmina sérica bovina (BSA): 0.5 mg/ml.

La concentración de BSA se comprueba con su lectura en el espectrofotómetro:

$$A_{280} = 6.6 \text{ DO para una solución con } 10 \text{ mg BSA/ml.}$$

$$A_{280} = 0.33 \text{ DO para } 0.5 \text{ mg/ml.}$$

Coomasie brilliant blue:

100 mg Coomasie brilliant blue

50 ml etanol al 95 %

100 ml ácido fosfórico al 85 %

Ajustar a 1 litro con agua. Filtrar en Whatman No. 1. Almacenar a 4 °C.

NaCl 0.15 M.

Curva estandar.

Se preparan las siguientes soluciones:

0.5 mg/ml BSA (μ l)	μ gP	0.15 M NaCl (μ l)
0 (Bco)	0	100
5	2.5	95
10	5	90
15	7.5	85
20	10	80

A cada eppendorf se agrega 1 ml de Coomasie brilliant blue y se agita.

IMPORTANTE: Se debe leer cada muestra exactamente 2 minutos después de agregar el Coomasie blue. Se lee a 595 nm en celdas de cuarzo.

Se grafica en papel semilogaritmico concentración de BSA vs A_{595} .

Los extractos con concentración de proteína desconocida se diluyen hasta que alcancen un valor dentro de la curva.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTAMINASA

La actividad enzimática de glutaminasa se determinó por medio de medir el amonio formado por la desamidación hidrolítica de la glutamina, mediante un método colorimétrico (Chaney y Marbach, 1962), modificado para glutaminasa en volúmenes pequeños (Bastarrachea, et al, 1993), consistente en la siguiente reacción:

La mezcla de reacción para la actividad de glutaminasa contiene 40 μ l de glutamina 12.5 mM en amortiguador KH_2PO_4 0.1 M pH 8, a los cuales se agregan 10 μ l de extracto, se

incuba a 37 °C durante los tiempos 0, 1, 2, 5, 10 y 20 minutos. La reacción se detiene al agregar 50 µl de ácido tricloroacético al 1.5 %.

Se centrifugan los eppendorfs de reacción 2 minutos. en una microfuga y se decanta el sobrenadante en otro tubo. Se toman entonces 20 µl del sobrenadante y se le agregan 180 µl de agua, 1 ml de solución I (fenol 0.1 M y nitroprusiato de sodio 0.05 g/l), se agita y enseguida se agrega 1 ml de solución II (hidróxido de sodio 0.12 M e hipoclorito de sodio 0.42 g/l). Se agita nuevamente y se deja en reposo 1 hora, al cabo de la cual se lee la densidad óptica a 625 nm.

Las lecturas se confrontan con un blanco preparado simultáneamente, con 200 µl de agua, 1 ml de solución I y 1 ml de solución II.

Asimismo, se prepara un estandar con 20 µl de cloruro de amonio 2 mM + 180 µl de agua + 1 ml de solución I + 1 ml de solución II.

De las lecturas obtenidas, se determina la actividad enzimática con la fórmula siguiente:

$$40 \text{ nmoles de NH}_3 \text{ (del standard)} \rightarrow 0.25 \text{ DO}_{625\text{nm}}$$

$$\text{Act}_{\text{nmoles}} = (40 \text{ nmoles} \times \text{DO}_{625\text{nm}} \text{ de la reacción}) / 0.25 \text{ DO}_{625\text{nm}}$$

El resultado obtenido en nmoles se divide entre el tiempo de la reacción, para obtener así nmoles / min de actividad, y entre la proteína para obtener la actividad específica, en nmoles /mgP · minuto.

ESCALAMIENTO DE PRODUCCION DE BIOMASA

Para la obtención de biomasa y glutaminasa suficientes para el proceso de purificación, se procedió a escalar el crecimiento de la cepa CE3pCD24 a un fermentador, cuya capacidad es de 1500 ml.

El procedimiento es el siguiente:

De la cepa CE3pCD24 conservada en glicerol al 80 % a -20 °C, se toman 100 µl, con los que se inoculan cajas Petri de PY-Nal-Tc, se estrian y se incuban a 30 °C durante 72 horas aproximadamente. Al mismo tiempo se estria una caja Petri con medio Luria como control de contaminación de la cepa.

Se requiere de una caja de PY estriada por cada dos PY líquidos de 100 ml cada uno.

Se inoculan matraces de 100 ml de PY Nal-Tc líquido con 4 asadas de las bacterias crecidas en caja. Se incuban los matraces a 30 °C en agitación constante de 200 rpm, durante 9 hrs aproximadamente.

Se requiere de un matraz con 100 ml de PY líquido por fermentador.

La preparación de los MM para fembatch se realiza de la manera siguiente:

9 litros (6 fermentadores)

K ₂ HPO ₄ 100x	90 ml
MgSO ₄ 100x	90 ml
Acido succínico 100x	90 ml
Glutamina	2.19 g por fermentador
CaCl ₂	15 ml por fermentador
FeCl ₃	1.5 ml por fermentador
Tc	1.5 ml por fermentador

Se esterilizan los fermentadores de 1500 ml con las sales y el ácido succínico en autoclave. Se agrega la glutamina sólida a los fermentadores cuando el medio ya se encuentra tibio. El cloruro de calcio, cloruro de fierro y tetraciclina, previamente esterilizados (el CaCl₂ en autoclave, el FeCl₃ y la Tc por filtración), se agregan cuando el medio se encuentra tibio.

Para la inoculación de los MM se procede de la manera siguiente:

Los PY líquidos crecidos durante 9 horas, se decantan en botellas de centrifuga estériles; se centrifugan 10 minutos a 10 krpm, a 4 °C. Se desecha el sobrenadante, se lava el precipitado y se resuspende en sales estériles.

Del resuspendido se toman 100 µl y se mezclan con 900 µl de sales y se lee a 540 nm. De la lectura resultante, se calcula la cantidad de inóculo para los medios mínimos, para su ajuste a una DO₅₄₀ inicial de 0.05, mediante la fórmula siguiente:

ml de inóculo = ((DO deseada x ml tomados del resuspendido) / DO resultante) x vol MM

ml de inóculo = ((0.05 x 0.1 ml) / Abs resultante) x 1500 ml.

Se inocula la cantidad necesaria del resuspendido de bacterias para cada fermentador y se incuban de 14 a 16 horas. a 30 °C y 200 rpm.

El crecimiento se cuantifica mediante la lectura a 540 nm de una alicuota de cada fermentador posterior a su tiempo de incubación.

La contaminación de los mismos se revisa tomando una muestra de cada fermentador que se estira en cajas de medio Luria-Bertani.

OBTENCION DEL EXTRACTO PROTEINICO INTRACELULAR

Del crecimiento en MM de los fermentadores, se lleva a cabo la obtención del extracto proteínico de *Rhizobium etli* bajo el protocolo siguiente:

Se obtienen las células bacterianas por centrifugación de los medios de cultivo (a 10 krpm durante 10 minutos). Se lavan los precipitados con agua y se resuspenden en amortiguador KH_2PO_4 + 5 mM Gln + 0.5 mM DTT (amortiguador KP). El amortiguador KP y subsecuente tratamiento del extracto se realizan a 4 °C (Ver siguiente sección, condiciones de estabilización). El volumen del resuspendido celular es de aproximadamente 50 ml por 6 fermentadores centrifugados (9 litros de medio de cultivo).

El resuspendido celular se divide en alícuotas de 12 ml, las cuales se sonicán en frío durante 10 minutos a 16 ciclos de potencia. (Sonicador Soniprep 150).

Las células rotas por sonicación se centrifugan 10 minutos a 12 krpm. Se decanta el sobrenadante y se conserva a 4 °C. El precipitado se desecha.

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE ALMACENADO DE LA ENZIMA

Se determinó la estabilidad de la actividad de glutaminasa en extractos almacenados en diferentes condiciones de temperatura, a fin de conservar a la enzima activa durante todo el proceso de purificación.

Las condiciones evaluadas fueron dos temperaturas de almacenado, -20 y -70 °C y dos formas de descongelación, la rápida y la lenta.

Como control se cuantificó actividad a un extracto crudo fresco, el cual posteriormente se almacenó en refrigeración a 4 °C para su posterior cuantificación.

Los tratamientos se incubaron durante toda la noche y se cuantificó actividad de glutaminasa para cada uno de ellos.

El descongelado rápido se lleva a cabo en baño María a 37 °C; mientras que el descongelado lento se lleva a cabo a temperatura ambiente.

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES QUE CONFIEREN ESTABILIDAD A LA GLUTAMINASA

Para determinar las condiciones en las cuales la actividad de glutaminasa se conserva estable, se llevaron a cabo los tratamientos siguientes:

I. Amortiguador de extracción.

Se llevaron a cabo dializados de extractos en las siguientes condiciones:

Amortiguador de extracción	Amortiguador de dializado
0.1 M	0.025 M
0.1 M	0.1 M
0.2 M	0.1 M
0.1 M	0.2 M
0.2 M	0.2 M

Los tratamientos estuvieron a 4 °C, con agitación constante y sin agitación, durante toda la noche (16 a 18 horas).

Se colectaron los extractos y se determinó actividad específica para confrontar los resultados con el control, que es un extracto sin dializar, en amortiguador de extracción KH_2PO_4 0.1M.

Los amortiguadores utilizados se prepararon con fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 ajustados a pH 8.

La efectividad de probables estabilizadores para la glutaminasa, se determinó en diferentes tratamientos de dializado, con la finalidad de observar diferencias en las actividades específicas de los extractos dializados sin agitación, a 4 °C durante toda la noche. Los estabilizadores fueron agregados en el amortiguador de dializado KH_2PO_4 0.2 M, pH 8, en las concentraciones siguientes:

TIPO	ESTABILIZADOR	CONCENTRACION (mM)
Antioxidante	Dithiothreitol (DTT)	0.5
Cationes divalentes	Ca	10
	Mg	10
	Mn	10
	Ca, Mg, Mn	10
Aminoácidos	Glutamina (Gln)	1
	Gln	5
	Glutamato (Glu)	1
	Gln, Glu	1
Nucleótidos	ADP	0.1
Inhibidores de proteasas	EDTA	10
	PMSF	1

Para cada tratamiento se utilizaron controles sin el probable estabilizador, tanto para la extracción como para el dializado.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE PROTEINAS POR SU TERMOESTABILIDAD

A partir de un crecimiento en fermentadores de la cepa CE3pCD24, se obtiene el extracto intracelular resuspendido en amortiguador KP 0.1 M (KH_2PO_4 , 0.1 M + 5 mM glutamina + 0.5 mM DTT), del cual se toman alícuotas de 1 ml, las cuales tuvieron el tratamiento siguiente:

Control sin calentar.

Calentado a 50 °C.

Calentado a 65 °C.

De los tratamientos calentados se toma una alícuota (200 μl) a los tiempos 2, 5, 10, 15 y 20 minutos.

Se centrifugan las alícuotas 10 minutos a 10 krpm. Se decanta el sobrenadante y el precipitado se desecha.

A cada sobrenadante se le mide actividad de glutaminasa y concentración de proteínas. Se confrontan resultados con el control y se calculan rendimientos.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE PROTEINAS POR CAMBIO DE pH

Se lleva a cabo el procedimiento anterior de obtención de alícuotas de 5 ml de extracto, para cada tratamiento de cambio de pH:

Control sin cambio de pH (8).

Cambio a pH 6.

Cambio a pH 5.

Para bajar el pH a los extractos, se utilizó ácido acético glacial sin diluir.

Se centrifugan los extractos

Se cuantifica glutaminasa y proteína a los sobrenadantes y se confrontan los resultados con el control, a fin de determinar rendimientos.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO

A partir de un crecimiento en fermentador de la cepa CE3pCD24, se obtiene el extracto intracelular resuspendido en amortiguador KP 0.1 M, (aproximadamente 50 ml), el cual se somete al siguiente tratamiento de precipitación de proteínas por su solubilidad, con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Scopes, 1988):

50 ml de extracto	+ 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → (10%) → Centrifugar 10' 12 krpm.
Sobrenadante	+ 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → (20%) → Centrifugar 10' 12 krpm.
Sobrenadante	+ 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → (30%) → Centrifugar 10' 12 krpm.
Sobrenadante	+ 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → (40%) → Centrifugar 10' 12 krpm.
Sobrenadante	+ 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → (50%) → Centrifugar 10' 12 krpm.

Al agregar el sulfato de amonio, para cada fraccionamiento, se agita para disolver a homogeneidad durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se procede a centrifugar.

Los precipitados de cada paso se resuspenden en 2 ml de amortiguador KP 0.1 M y se dializan toda la noche en 1000 ml del mismo amortiguador KP, a 4 °C.

Posteriormente se cuantifica actividad de glutaminasa y proteína (mediante los métodos Lowry y Bradford) a cada dializado.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA.

I. Preparación de la resina DEAE-celulosa.

Hidratarla con H₂O desionizada durante media hora.

HCl 0.5 N durante media hora.

H₂O desionizada durante media hora.

NaOH 0.5 M durante media hora.

H₂O desionizada durante media hora.

NaOH 0.5 M durante media hora.

Enjuagar varias veces con agua desionizada.

Agregar azida de sodio para su almacenamiento.

La resina previamente preparada se empaca en columna de 25 x 2.4 cm y se equilibra con el mismo amortiguador en que será colocado el extracto, hasta que el pH del eluido de la columna sea de 8 y sin variaciones..

El empacado y corrida del extracto se llevan a cabo a 4 °C.

Se probaron las condiciones de pegado y despegado siguientes:

AMORTIGUADOR DE EQUILIBRADO (KP)	AMORTIGUADOR DE LAVADO (KP)	GRADIENTE LINEAL DE ELUSION (250ml vs 250ml)
0.2 M	0.2 M	0.2 M KP vs 0.2 M KP + 1 M KCl
0.05M	0.05M	0.05 M KP vs 0.2 M KP
0.1 M	0.1 M	0.1 M KP vs 0.2 M KP + 1 M KCl
0.1 M	0.1 M	0.1 M KP vs 1 M KP
0.05M	0.1 M	0.1 M KP vs 1 M KP

Se colectan fracciones de 8 ml aproximadamente y se les mide actividad de glutaminasa.

El volumen del amortiguador de lavado empleado es seleccionado dependiendo de la lectura a 280 nm de las fracciones colectadas, ya que las proteínas que no se pegan a la columna son lavadas por el amortiguador y gradualmente se observa un decremento en la absorbencia de las fracciones a esas longitudes de onda (donde absorben ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente). El lavado se suspende cuando las lecturas son muy bajas y constantes.

En seguida se aplican los gradientes y se cuantifica actividad a cada fracción, así como su absorbencia a 280 nm, a fin de observar el patrón de elusión de proteínas. Se seleccionan aquellas fracciones con actividad, se colectan y se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%.

Al precipitado se resuspende con amortiguador KP 0.1 M y se dializa en 1000 ml durante toda la noche contra el mismo amortiguador, a 4 °C.

A los dializados se cuantifica actividad y proteína.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA EN OCTYL-AGAROSA

Preparación de la resina Octyl- Agarosa:

Se enjuaga varias veces con agua desionizada.

Se enjuaga con un volumen de etanol al 96%.

Se almacena a 4 °C con azida de sodio.

La resina previamente lavada se empaca en una columna de 15 x 1 cm y se equilibra con el mismo amortiguador en que será colocado el extracto, hasta que el pH del eluido de la columna sea de 8 y sin variaciones.

El empaquetado y corrida del extracto se llevan a cabo a temperatura ambiente.

Se probaron las condiciones de pegado y despegado siguientes:

Amortiguador de equilibrado (KP)	Amortiguador de lavado (KP)	Gradiente lineal de elusión (50 ml vs 50 ml)
0.5 M	0.5 M	0.5 M KP vs H ₂ O + DTT + Gln
1 M	1 M	1 M KP vs H ₂ O + DTT + Gln

Se colectan fracciones de 3.5 ml aproximadamente y se les mide actividad de glutaminasa, se seleccionan aquellas con actividad, se colectan y se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. Al precipitado se resuspende con amortiguador KP 0.1 M y se dializa en 1000 ml del mismo durante toda la noche, a 4 °C. A los dializados se cuantifica actividad y proteína.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR FILTRACION EN GEL EN SEPHACRYL S-200.

Preparación de la resina:

Se resuspende la resina en amortiguador 0.2 M KH_2PO_4 pH 8, en una proporción de 1:2. Se agita a homogeneidad y se deja reposar de 15 a 30 minutos.

Se decanta el sobrenadante con las partículas finas. Se repite dos veces este procedimiento.

Se degasifica la suspensión antes de su empaque en la columna.

La columna (90 x 1.6 cm) se llena 1/3 con amortiguador KP 0.2 M para su equilibrado. Se agrega poco a poco la resina previamente preparada y sin flujo, dejando que se sedimente durante 15 minutos. Enseguida se abre el flujo y se agrega más resina constante y lentamente, hasta que se alcance el volumen deseado.

Se lava entonces la columna con 2 o 3 volúmenes de amortiguador KP.

Todo el procedimiento anterior y almacenamiento de la columna se llevan a cabo a 4°C.

Es importante que la columna montada sea lavada constantemente con amortiguador KH_2PO_4 0.2 M, a fin de evitar que se contamine. Se deja un poco de volumen de amortiguador sobre el volumen de la resina y se agrega una pizca de azida de sodio.

Determinación del volumen de exclusión.

Para cuantificar el volumen muerto de la columna se utiliza Azul Dextrán (masa molecular 2,000,000 Da). Se aplican 4 mg / 2 ml de amortiguador KP y se colectan en seguida fracciones de 2.75 ml. Se juntan todas las fracciones hasta el eluido del Azul Dextrán (detectado a 280 nm, considerando su elusión a un pico de A_{280} de 1 DO).

Este volumen de elusión será el volumen de exclusión o V_0 .

Curva estándar de Sephacryl S-200.

Para la elaboración de la curva estándar de la columna, se utilizaron los siguientes marcadores de masa molecular, y a los que se les determinó el volumen de elusión V_e .

Proteínas	Masa molecular aproximada (en kDa)
Citocromo C	12.4
Anhidrasa carbónica	29
Albúmina	66
Alcohol deshidrogenasa	150
β -amilasa	200

Para la elaboración de la curva estándar de Sephacryl S-200, se grafica la relación $V_{e\text{marcadores}} / V_{0\text{Azul Dextrán}}$ como variable independiente, contra la masa molecular de los marcadores como variable dependiente, en papel semilogarítmico.

Se realiza una regresión lineal a fin de obtener la pendiente y ordenada al origen de la curva y su fórmula, que será utilizada para calcular el peso molecular de la glutaminasa.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE LIGANDO COLORANTE EN CIBACRON AZUL.

Preparación de la resina:

Se resuspende la resina en agua y se deja sedimentar aproximadamente media hora.

Se decanta el sobrenadante y se lava la resina con etanol al 96 % y urea 8 M.

Se lava la resina con agua varias veces.

Se resuspende la resina en amortiguador KP 0.1 M, pH 8.

Se almacena a 4°C con azida de sodio.

La resina previamente lavada se empa en columna de 15 x 1 cm y se equilibra con el mismo amortiguador en que será colocado el extracto, hasta que el pH del eluido de la columna sea de 8 y sin variaciones.

El empaclado y corrida del extracto se llevan a cabo a temperatura ambiente.

Se colectan fracciones de 3.5 ml aproximadamente y se les mide actividad de glutaminasa.

Se probaron las condiciones de pegado y despegado para la glutaminasa que a continuación se observan:

Amortiguador KP de equilibrio	Amortiguador KP de lavado	Gradiente lineal de atusión (30 ml vs 50 ml)
0.1 M	0.1 M	0.1 M KP vs 1 M KP
0.1 M	0.1 M	0.1 M KP vs 1 M KP + 15mM gln

Se seleccionan aquellas fracciones con actividad, se colectan y se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50 %. Al precipitado se resuspende con amortiguador 0.1 M KP y se dializa en 1000 ml del mismo amortiguador durante toda la noche, a 4 °C. A los dializados se cuantifica actividad y proteína.

ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA.

Para la determinación de las subunidades que integran a la glutaminasa, se llevó a cabo la electroforesis en gel desnaturizante SDS-poliacrilamida, de la siguiente manera:

Preparación de los geles:

	GEL SEPARADOR 30 ml (un gel)	GEL CONCENTRADOR 14 ml (2 geles)
Acrilamida al 30 %	10 ml	2.25 ml
Bisacrilamida al 2 %	4 ml	0.925 ml
1 M Tris base pH 8.8	11.25 ml	
1 M Tris base pH6.8		1.64 ml
SDS 20 %	0.29 ml	0.13 ml
Agua	4.4 ml	9 ml
Temed	30 μ l	30 μ l
Persulfato de amonio al 10 %	40 μ l	40 μ l

Amortiguador de corrida:

Tris base 12 g

Glicina 57.6 g

Aforar a 1 litro con H₂O para una solución 5 X.

1000 ml de amortiguador Tris-Glicina 5 X + 20 ml SDS 20 %

Aforar a 5 litros con H₂O.**Solución Magic Mix:**

SDS 100 mg

Mercaptoetanol 100 µl

EDTA 7.4 mg

Glicerol 1 ml

1 M Tris base pH 6.8 0.5 ml

1 pizca de azul de bromofenol

Aforar a 10 ml. Hacer alicuotas de 1 ml y congelar a -20 °C.

Coomasie blue:

Coomasie brilliant blue 0.06 %

Metanol 30 %

Acido acético 10 %

Agua 60 %.

Solución desteñidora:

Acido acético al 10 %.

Procedimiento:

Se lava perfectamente la cámara de electroforesis, especialmente los vidrios, los separadores y los peines que entran en contacto directo con el gel. Se montan y preparan para cargar los geles.

Se preparan los geles separadores uno a uno, se cargan evitando burbujas y al cabo de su carga se agrega lentamente agua, a fin de que el gel se forme completamente horizontal. Ya polymerizados los geles separadores, se seca el agua que se agregó por encima de ellos y se prepara el gel concentrador, el cual se agrega por un lado de los peines,

previamente colocados, evitando las burbujas. Se llenan por completo los espacios de cada carril, y se deja polimerizar. Se retiran los peines y los carriles formados se lavan 3 veces con agua. Se secan perfectamente y están listos para utilizarse.

Los geles en su soporte, se colocan en la cámara llena de amortiguador; la parte superior de la cámara se llena de amortiguador también, cuidando que ambos polos de la cámara queden sumergidos. Ya sumergidos los geles, se aplican con mucho cuidado las muestras, previamente preparadas de la siguiente manera:

¼ de muestra + ¼ de magic mix. Calentar 2 minutos a ebullición.

Los marcadores de peso molecular se preparan de la misma manera.

Se cargan todos los carriles y se corre a corriente constante:

gel concentrador	5 mA
gel separador	10 mA

Al término de la corrida, se sacan los geles y se tiñen con coomasie blue, durante 1 hora aproximadamente, a 40 °C.

Se destiñen con ácido acético a 40 °C.

RESULTADOS

CONDICIONES DE ALMACENADO DE LA ENZIMA

Las condiciones de almacenado probadas, presentaron los resultados que se muestran en la tabla 2.

De los tratamientos probados, se observa que los extractos congelados con su inclusión a -70°C , que se descongelan rápidamente, en baño María a 37°C , presentan una actividad igual a la del extracto fresco control, por lo que se utilizaron esas condiciones de almacenado para todo el proceso de purificación.

Se observó que la temperatura de congelado es muy importante para mantener la actividad de la glutaminasa y que el descongelado, presenta también una variación significativa en cuanto a la actividad recuperada, pero no es tan drástica como la del proceso de congelación, ya que al congelar rápidamente se recupera mayor actividad (86 a 100 %) independientemente del proceso de descongelado utilizado, dicha actividad aumenta si el descongelado es rápido también.

Tabla 2. Condiciones de almacenado de la glutaminasa de *R etli*.

Congelado	Descongelado	Porcentaje de actividad recuperado
a -70°C	rápido	100
a -20°C	rápido	59
a -70°C	lento	86
a -20°C	lento	57

Los porcentajes se obtuvieron en relación a la actividad específica del extracto fresco, de la cepa CE3pCD24 antes de ser almacenado en las condiciones indicadas.

Se determinó la actividad específica de los extractos almacenados en refrigeración (4°C), en que se obtuvo un porcentaje de actividad recuperada de sólo un 7 %.

Para todo el proceso de purificación, es posible utilizar la congelación de los extractos como una posibilidad dentro del esquema, a fin de hacerlo práctico y cómodo.

CONDICIONES QUE CONFIEREN ESTABILIDAD A LA GLUTAMINASA

De las pruebas de estabilidad realizadas para la conservación de la actividad de glutaminasa, se obtuvieron los resultados siguientes:

Para la estabilidad de la enzima respecto a la fuerza iónica del amortiguador de extracción y dializado utilizado, se determinó que la actividad recuperada es superior conforme se aumenta la molaridad del amortiguador de extracción, como de dializado, lo que se puede observar en la tabla 3, en que las mejores condiciones de extracción y dializado fueron las del amortiguador KH_2PO_4 0.2 M, en el sistema de dializado sin agitación.

Esto hace suponer que la estructura tridimensional de la enzima requiere de la presencia de iones en altas concentraciones, que pueden estabilizarla o bien que el sitio activo presenta residuos que requieren fuerza iónica para mantener su configuración.

Tabla 3. Pruebas de la estabilidad de la glutaminasa utilizando amortiguadores de diferente molaridad.

Amortiguador de extracción KH_2PO_4	Amortiguador de dializado KH_2PO_4	Con agitación (% de Actividad)	Sin agitación (% de Actividad)
0.1 M	0.025 M	2	4
0.1 M	0.1 M	5	16
0.2 M	0.1 M	5	24
0.1 M	0.2 M	21	52
0.2 M	0.2 M	21	67

Los porcentajes de actividad fueron obtenidos en relación a la actividad específica del extracto fresco.

La prueba de los posibles estabilizadores de la actividad de glutaminasa se llevaron a cabo en dializados a 4 °C, durante toda la noche, sin agitación, en amortiguador KH_2PO_4 0.2M.

Se observa que la actividad de glutaminasa en presencia del sustrato, la glutamina, del ADP y del agente antioxidante dithiothreitol, aumentan de manera determinante el porcentaje de actividad recuperado después del dializado de los extractos (Tabla 4):

Tabla 4. Prueba de diferentes probables estabilizadores de la actividad de glutaminasa.

TIPO	ESTABILIZADOR EN EL DIALIZADO	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD
Control	Extracto fresco	100
Control	sin estabilizador, sin dializar	80
Control	sin estabilizador, dializado	28
Antioxidante	Dithiothreitol (DTT) 0.5 mM	61
Cationes divalentes	Cu 10 mM	38
	Mg 10 mM	34
	Mn 10 mM	31
	Ca, Mg, Mn 10 mM	18
Aminoácidos	Glutamina (Gln) 1 mM	75
	Gln 3 mM	81
	Glutamina (Gln) 1 mM	80
	Gln 3 mM + DTT 0.5 mM	100
Nucleótidos	ADP 5 mM	75
	ATP 5 mM	45
Inhibidores de proteasas	EDTA 5 mM	45
	PMSE 1 mM	12

Los porcentajes se tomaron respecto a la actividad específica del extracto fresco como control.

Para todo el proceso de purificación de las glutaminasas, se utilizaron las condiciones siguientes de dializado y extracción de las enzimas:

Amortiguador KH_2PO_4 0.2 M o 0.1 M (dependiendo del paso de purificación y su factibilidad); glutamina 5 mM; y dithiothreitol 0.5 mM (Amortiguador KP).

Las condiciones que confieren estabilidad a la glutaminasa permiten establecer algunas consideraciones respecto a su estructura:

Es probable que la glutaminasa presente grupos sulfhidrilo en su composición, que le permitan conservar una configuración tridimensional adecuada para su actividad catalítica, la cual es modificada por la oxidación de esos grupos, lo que se traduce en su inactivación, probablemente dada por el cambio en su configuración, o bien, la modificación por oxidación de residuos importantes en el proceso de reconocimiento y/o catálisis del sustrato.

La alta molaridad en el amortiguador de extracción necesaria para conservar su actividad indica que su estabilidad es modificada por la concentración de las proteínas presentes y por la fuerza iónica del medio.

La estabilidad de la actividad dada por la presencia del ADP sugiere fuertemente la posibilidad de que la glutaminasa presente sitios alostéricos para éste y otros nucleótidos de adenina, que modulen su actividad catalítica.

Los cationes divalentes no ejercieron ningún papel como estabilizadores o moduladores de la actividad de la glutaminasa, como se observa en la glutaminasa B de *E. coli*.

Los inhibidores de proteasas PMSF y EDTA tampoco presentaron ninguna influencia en la pérdida de actividad de glutaminasa en los dializados, por lo que la actividad de proteasas queda descartada como probable influencia negativa en la conservación de la actividad en dializados. En otros sistemas se observa que durante los dializados se acrecienta la actividad proteolítica, pero este no es el caso.

Debido a que el glutamato es un producto final de la actividad de la glutaminasa, podría actuar como un modulador negativo, como en el caso de la K-glutaminasa de mamíferos, o simplemente como un estabilizador de la actividad al interaccionar con el sitio de unión de la glutamina, cuando ésta es hidrolizada, dando como producto al glutamato, con lo que la estructura tridimensional de la enzima se vería más estable. Es probable el segundo caso, ya que se observó que la actividad se conservó en un 70 %.

La glutamina evidentemente favorece la estabilidad de la enzima, al interaccionar directamente en el sitio catalítico de la enzima, le confiere estabilidad y actividad constante, lo que permite que prácticamente el 80 % de la actividad se conserve, y más aún, al utilizar simultáneamente el antioxidante, la estabilidad de la enzima es de un 100 %, por lo que se deduce que el sustrato y el antioxidante se complementan para actuar en sitios de la enzima susceptibles a los agentes desestabilizadores.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE PROTEINAS POR SU TERMOESTABILIDAD Y POR CAMBIO DE pH

Las pruebas de precipitación diferencial de proteínas por su termoestabilidad, no tuvieron el éxito esperado, ya que la glutaminasa de la cepa CE3pCD24 es termolábil, y pierde del 80 a 90 % de su actividad a los 15 minutos de calentado a 50 °C. Se pierde por completo su actividad a los 5 minutos de calentado a 65 °C.

Los ensayos de termoestabilidad posteriores, realizados por el químico Luis Sánchez Linares, en nuestro laboratorio, demostraron que la glutaminasa de la cepa LM16 presenta termoestabilidad a los 15 minutos de calentado a 50 °C, y conserva su actividad en un 80 %; mientras que la glutaminasa de la cepa silvestre pierde del 80 a 90 % de su actividad a los 15 minutos de calentado a 50 °C (Fig. 3).

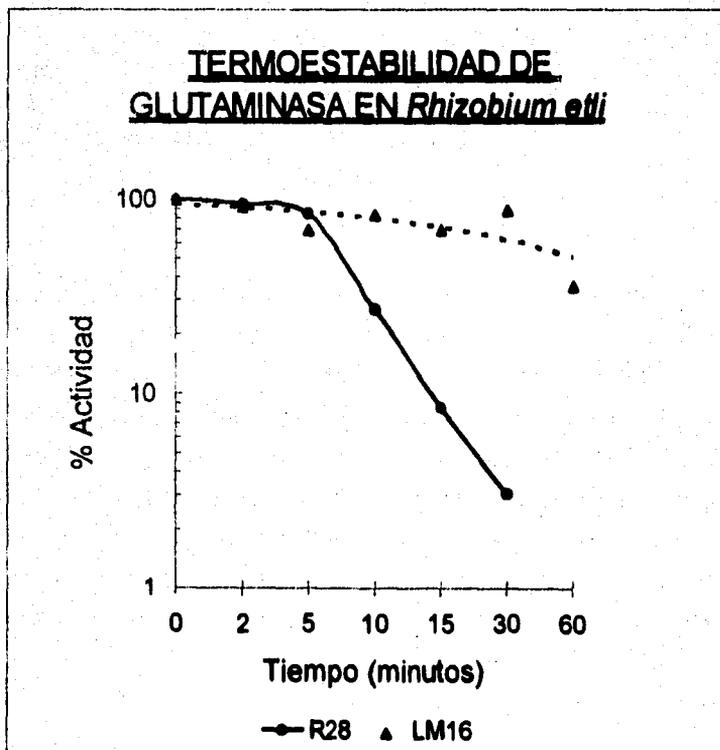


Figura 3. Termoestabilidad de las glutaminasas de *Rhizobium etli*.

Estos datos concuerdan con lo que se obtuvo en la cuantificación de actividad para la cepa CE3pCD24, y para la cepa LM16 en el mismo ensayo. La glutaminasa de la cepa LM16 pierde su actividad a 65 °C durante los primeros 10 minutos de calentado.

Si bien los ensayos de precipitación diferencial de proteína por su termoestabilidad no tuvieron relevancia en cuanto a un paso para la purificación de la glutaminasa, sí la tuvieron para sugerir que existen un par de isoenzimas de glutaminasa: una termolábil, presente en las cepas CE3pCD24 y la silvestre, que representa el 80 % de la actividad total de glutaminasa de cada una; y otra glutaminasa que es termoestable, que es la única presente en la cepa LM16, y que representa en las cepas CE3pCD24 y la silvestre, el 20 % restante de la actividad total (Tabla 5).

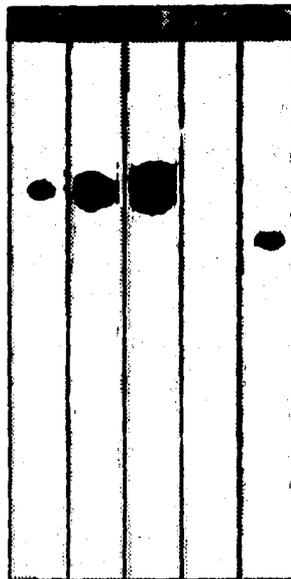
Tabla 5. Glutaminasas de *R. etli* en diferentes cepas y su termoestabilidad.

Cepa	Termolábil	Termoestable	Total
CE3 (Silvestre)	80 %	20 %	100 %
LM16	—	100 %	100 %
CE3pCD24	80 %	20 %	100 %

Los estudios realizados con electroforesis en gel revelados por actividad, sugieren la existencia de un par de isoenzimas de glutaminasa en *Rhizobium etli*, pues se presentan bandas con diferente movilidad electroforética reveladas por actividad *in situ* (Fig. 4).

Es importante observar que en los extractos crudos utilizados para detectar la actividad de glutaminasa, se observa una sola banda en la cepa silvestre (R28) y en la cepa CE3pCD24 que presentan una migración similar, que corresponden a la glutaminasa termolábil, mientras que en el extracto crudo de la cepa LM16 no se logra ver ninguna banda, que sí se aprecia en el extracto parcialmente puro de la misma cepa, con un patrón de migración diferente al de la glutaminasa de la cepa silvestre y de la CE3pCD24, que corresponde a la glutaminasa termolábil.

Figura 4. Migración electroforética de las glutaminasas de *Rhizobium etli*.



(A) CE3, extracto crudo. (B) CE3pCD24, extracto crudo.
 (C) CE3pCD24, extracto purificado. (D) LM16, extracto crudo.
 (E) LM16, extracto purificado.

Todos los extractos crudos obtenidos de crecimiento en medio mínimo glutamina-succínico. Los extractos parcialmente purificados se obtuvieron a partir de los pasos de sulfato de amonio y DEAE-celulosa.

En cuanto a la precipitación diferencial de proteína por cambio en el pH, se obtuvieron resultados negativos, ya que la actividad de glutaminasa se detecta sólo a pH 8, mientras que a pH 6 y pH 5 se pierde por completo (sólo se recupera un 2 % de actividad).

La precipitación diferencial por termoestabilidad y por cambio de pH no son aplicables para las glutaminasas de *R. etli* como procedimientos de purificación, por lo que no se utilizaron.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO

El primer paso del protocolo de purificación de las glutaminasas, presentó los resultados siguientes:

La mayor cantidad de glutaminasa se precipita entre 20 y 40 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por lo que se decidió realizar los cortes a 20 y 35 % de saturación, recuperando el precipitado obtenido al 35 % de saturación, en el que se obtiene un rendimiento del 80 al 85% de actividad específica de glutaminasa, con un factor de purificación de 1.5 a 2.

Se observa que ambas glutaminasas precipitan en los porcentajes de saturación elegidos.

Esto nos indica que las glutaminasas se sitúan en un plano intermedio respecto de su solubilidad en comparación con el resto de las proteínas, porque los porcentajes de saturación bajos no la precipitan, sino que se requiere de un porcentaje menor al 50 % de saturación para precipitar toda la glutaminasa (Fig 5).

PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

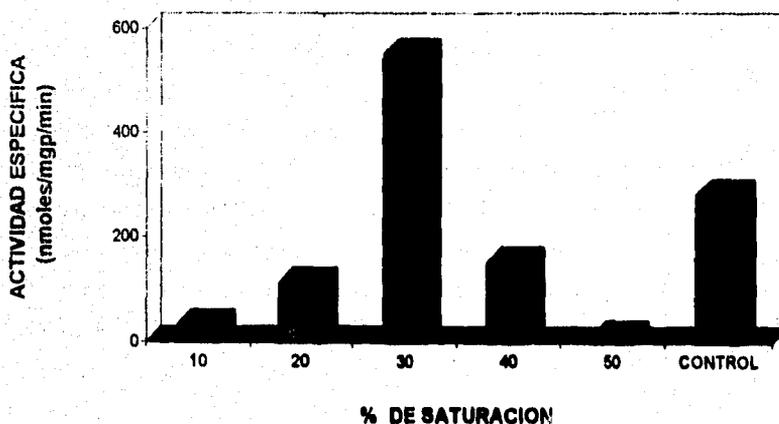


Figura 5. Patrón de Precipitación de la glutaminasa con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Durante la estandarización del método de fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como primer paso en el protocolo de purificación, se presentó un problema de reproducibilidad de resultados, ya que en un principio no se tomó en cuenta el tiempo de agitación y homogenizado del extracto al agregar el sulfato de amonio, ni se consideró la temperatura a la cual se realizaron las primeras pruebas de precipitación. Estos parámetros resultaron claves para obtener datos reproducibles, pues se llevaron a cabo los cortes con sulfato de amonio agregando la sal sólida a los extractos, con el porcentaje de saturación indicado, dejando que la sal se disolviera en agitación constante durante 30 minutos a 4 °C, logrando con ello que el sistema se homogeneizara en un 100 % y que la glutaminasa presentara un comportamiento de precipitación reproducible y con un alto porcentaje de recuperación.

Si bien no se lograron factores de purificación significativas en este primer paso, es muy importante llevarlo a cabo, porque el extracto crudo tiene restos celulares, ácidos nucleicos, lípidos, etc., que son removidos en su mayoría por esta precipitación diferencial.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA

Las condiciones utilizadas para la purificación de las glutaminasas en DEAE celulosa fueron:

Equilibrado de la columna con amortiguador KH_2PO_4 0.05 M pH 8.

Aplicación del precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resuspendido en amortiguador 0.1 M KP.

Lavado con el mismo amortiguador KP 0.1 M.

Gradiente lineal amortiguador KP 0.1 M (250 ml) vs amortiguador KP 1 M (250 ml).

En esta resina, se lograron rendimientos del 25 al 30 % de recuperación de la actividad específica de la glutaminasa termolábil, con un factor de purificación que oscila entre 4 y 5.

Otras condiciones utilizadas no rindieron los resultados esperados: al utilizar amortiguador KP 0.2 M para el equilibrado y lavado de la resina, no se logró pegar la glutaminasa, supuestamente por la alta fuerza iónica del amortiguador que pudo neutralizar las cargas tanto de la resina como de la enzima, por lo que no interaccionaron. Al utilizar un amortiguador con mucho menor fuerza iónica (KP 0.05 M) para el equilibrado y el lavado, se observó que la glutaminasa interacciona con la resina, pero al momento de recuperarla, los

rendimientos son muy bajos, lo que se atribuyó a la baja estabilidad de la enzima en esas condiciones de concentración de sales (ver estabilidad de la glutaminasa).

El equilibrado de la resina se llevó a cabo con el amortiguador KP 0.05 M por observarse que la interacción iónica en esas condiciones es efectiva, pero el lavado y la elusión de la glutaminasa se llevó a cabo con un amortiguador KP 0.1 M, el cual confiere mucho mayor estabilidad a la enzima, logrando con ello los rendimientos ya mencionados.

Se probaron gradientes de elusión con KCl 1 M, sin variación en el amortiguador KP utilizado, con los que no se observó actividad recuperada, por lo que se consideró que esta sal no presenta interacción importante en la relación enzima-resina, por lo que el gradiente de sales utilizado se basó únicamente en el aumento de fuerza iónica del mismo amortiguador KP.

El patrón de elusión de la glutaminasa termolábil se presenta en la figura 6. Obsérvese que al salir la gran mayoría de las proteínas que no se pegan a la resina, sale también un pequeño pico de actividad de glutaminasa, el cual se debe probablemente a la saturación de la columna, que en un principio se consideró como otra glutaminasa, lo cual fue aclarado al realizar pruebas de termoestabilidad a los dos picos de actividad, encontrando que su comportamiento era exactamente el mismo.

La glutaminasa termoestable, de la cepa LM16, presentó un patrón de elusión similar al que presentó la glutaminasa termolábil de la cepa CE3pCD24 (dato no mostrado) y se enriqueció aproximadamente 6 veces, con un rendimiento muy bajo (menor al 10 % respecto a la actividad inicial), con una actividad específica de 100 nmoles / mgP · min. Esto indica que la glutaminasa termoestable presenta alguna característica diferente a la termolábil, que le confiere menor estabilidad durante el proceso de separación en DEAE-celulosa, por lo que es necesario que se modifiquen las condiciones utilizadas para aumentar el rendimiento.

Sin embargo, la elusión similar que presentaron ambas glutaminasas en DEAE permite proponer que ambas glutaminasas presentan carga negativa a pH 6 y que sus características iónicas son similares.

A partir de este paso, únicamente se continuó con la purificación de la glutaminasa termolábil.

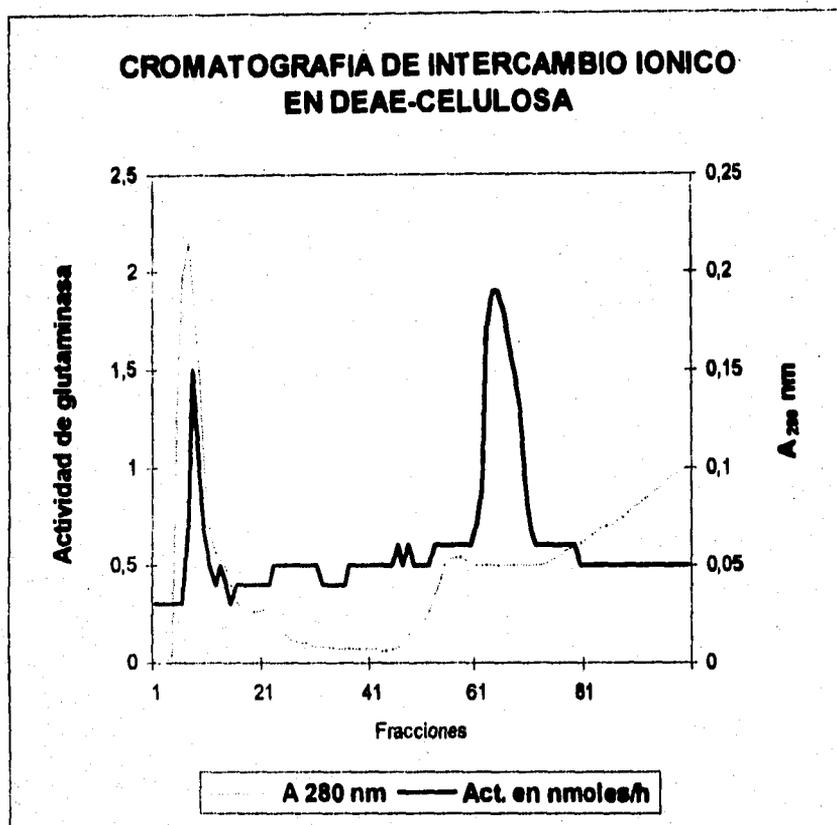


Figura 6. Patrón de elusión de la glutaminasa en cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA EN OCTYL AGAROSA

Las condiciones utilizadas para la purificación de la glutaminasa termolábil en Octyl-agarosa fueron las siguientes:

Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Equilibrado de la columna con amortiguador KP 1 M pH 8.

Aplicación de la muestra obtenida de DEAE-celulosa, concentrada y resuspendida en amortiguador KP 0.1 M y dializada 1 hora en amortiguador KP 1 M, antes de su aplicación a la resina.

Lavado con el mismo amortiguador (1 M KP).

Gradiente lineal KP 1 M (50 ml) vs H₂O (50 ml).

La resina hidrofóbica se comportó de una manera muy noble con la glutaminasa, ya que se obtuvieron rendimientos cercanos al 100 % respecto al obtenido en el paso previo en DEAE (con un rendimiento general del 25 % respecto a la actividad inicial).

Se logró un factor de purificación cercano a 20 respecto de la actividad específica inicial.

El éxito en el pegado de la glutaminasa termolábil a esta resina permite suponer que la estructura tridimensional de la enzima presenta zonas o regiones de residuos hidrofóbicos externos importantes, cuya interacción con la resina de grupos octyl permitió su separación de otras proteínas que no los presentan. El patrón de elusión de la glutaminasa termolábil en Octyl-agarosa se presenta en la figura 7. Nuevamente se observa un pequeño pico de actividad en los primeros tubos de lavado, que coincide con el pico de proteínas que no interaccionaron con la resina, que probablemente se saturó. La razón por la cual no se utilizó resina en exceso es que se pierde más rendimiento por pegado inespecífico y elusión no gradual al utilizar una relación resina/proteína muy alta.

Se observa en la figura 7 que la elusión de la glutaminasa se presenta al final del gradiente, cuando la concentración de sales es cercana a 0.2 M de KP, por lo que se bajó la molaridad de pegado y lavado a 0.5 M de KP, donde se esperaba que hubiera interacción, pero no fue así, ya que en esas condiciones no se logró pegar la glutaminasa a la resina, por lo que se decidió conservar una mayor fuerza iónica para el pegado y el gradiente ya mencionado.

Es importante considerar que las condiciones de pegado no son exactamente las contrarias al proceso de despegado, en este caso se observó que la interacción de la glutaminasa con los grupos octyl sólo se da en alta fuerza iónica, y para el proceso de despegado se requiere de mucho menor fuerza iónica de la esperada.

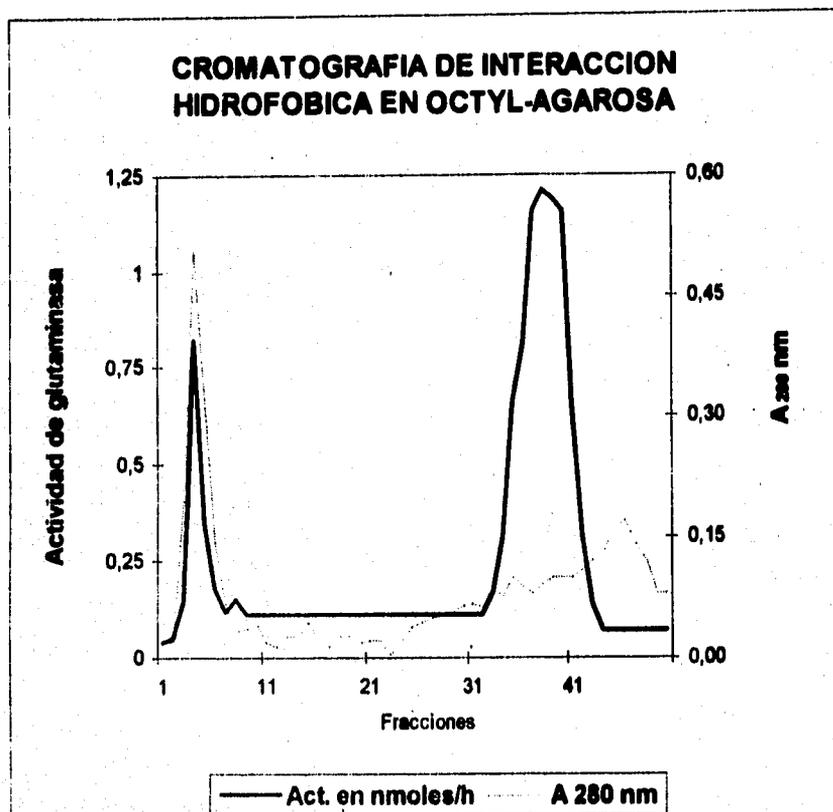


Figura 7. Patrón de elusión de la glutaminasa en cromatografía de interacción hidrofóbica en Octyl-agarosa.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR FILTRACION EN GEL EN SEPHACRYL S-200

La resina de filtración en gel Sephacryl S200 utilizada como cuarto paso de purificación, fué de gran utilidad para calcular la masa molecular de la enzima en su estado nativo.

Esta resina se equilibró en amortiguador 0.2 M KH_2PO_4 , y se lavó con amortiguador KP 0.2 M antes de la aplicación del extracto obtenido de Octyl-agerosa y durante su elusión.

Para la utilización de la resina Sephacryl S-200, se determinó la curva de calibración, (Figura 8) mediante los estándares siguientes:

Proteínas	Mass molecular (kDa)	V_e (ml)	V_e/V_o
Citocromo C	12.4	124.2	1.70
Anhidrasa carbónica	29	113.4	1.55
Albúmina	66	94.5	1.29
Alcohol deshidrogenasa	150	86.4	1.18
β -amilasa	200	83.7	1.14

Con el ajuste de los datos obtenidos mediante regresión lineal, (ver Métodos) se obtuvo la ecuación de la recta, cuyo parámetros son los siguientes:

$$y = 36845e^{-4.6883x}$$

La glutaminasa termolábil presentó un volumen de elusión de 93.4 ml, con una relación $V_e / V_o = 1.2798$, con lo que se obtuvo su masa molecular en estado nativo, mediante el uso de la ecuación de la recta:

$$MM_{\text{glinasa}} = 36845e^{(-4.6883 \times 1.2798)}$$

$$MM_{\text{glinasa}} = 90.82 \text{ kDa.}$$

Además de la obtención de la masa molecular de la glutaminasa mediante la filtración en gel, se obtuvo un buen rendimiento al recuperar la actividad eluida, que fue de un 10 %, con un factor de purificación cercano a 56.

Una ventaja sumamente importante fue la de utilizar un amortiguador de fuerza iónica alta para el equilibrado de la resina, lo que evita que existan interacciones iónicas durante el eluido de las proteínas, lo que confiere también mayor estabilidad a la glutaminasa durante el proceso.

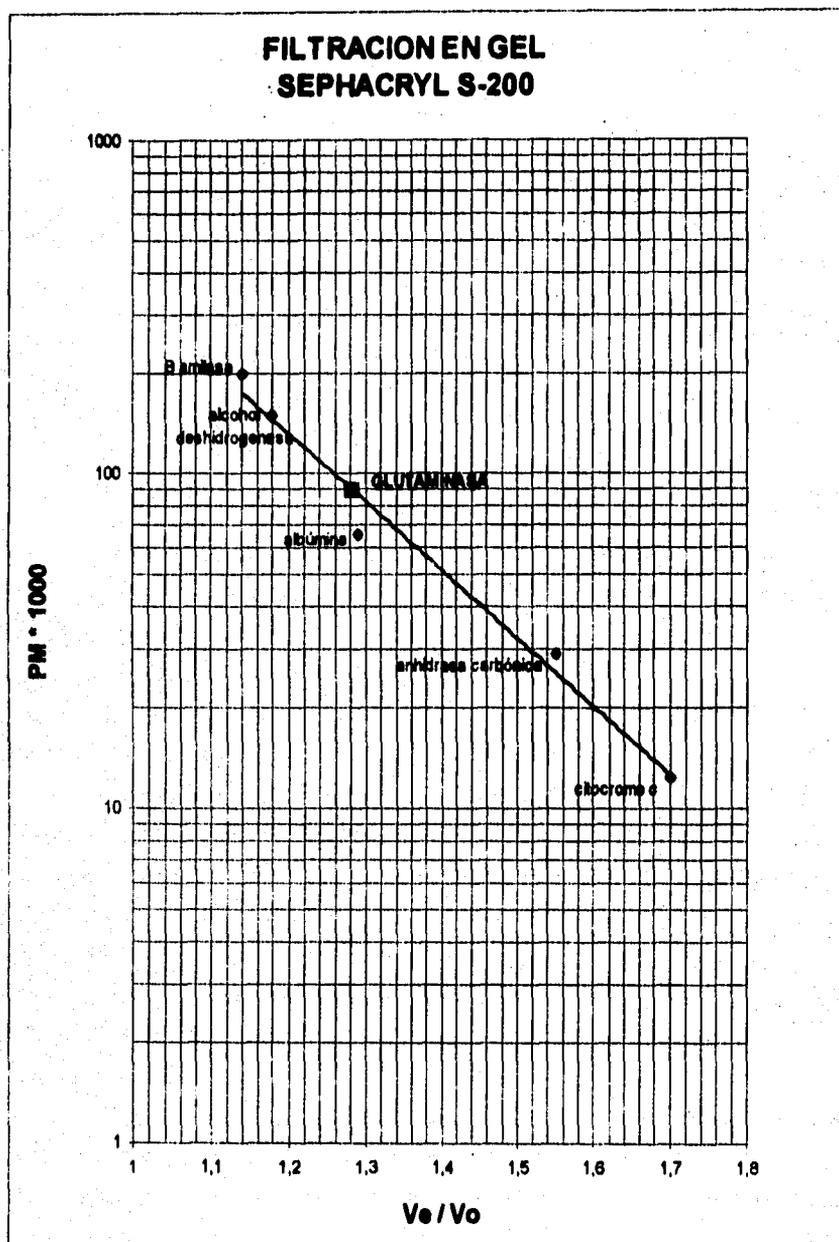


Figura 8. Filtración en gel Sephacryl S200 de la glutaminasa termolábil.

PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA POR CROMATOGRAFIA DE LIGANDO COLORANTE EN CIBACRON AZUL

Las condiciones utilizadas para la purificación de la glutaminasa termolábil en Cibacrón azul fueron las siguientes:

Equilibrado de la columna con amortiguador KP 0.1 M pH 8.

Aplicación de la muestra obtenida de la columna de filtración en gel, concentrada y resuspendida en amortiguador KP 0.2 M, dializada 1 hora en amortiguador KP 0.1 M, a temperatura ambiente, previo a su aplicación.

Aplicación de la muestra y lavado con el mismo amortiguador. (0.1 M KP).

Gradiente lineal KP 0.1 M (50 ml) vs KP 1 M (50 ml).

La resina de Cibacrón azul resultó ser excelente para el protocolo de purificación, ya que se logró obtener una purificación cercana a la homogeneidad, con un factor de purificación de 58.

Desafortunadamente, el rendimiento de esta resina es muy bajo, ya que se recupera una actividad del 0.3 % respecto a la inicial, atribuible a la alta pureza de la enzima, que le confiere menor estabilidad, o bien, a lo extendido de la elusión de la enzima a lo largo del gradiente, (Ver patrón de elusión de la glutaminasa, en la figura 9), con lo que se diluyó y muy probablemente se inactivó en alto porcentaje.

La estructura tridimensional de los residuos de la resina de Cibacrón azul, similar a la estructura del NAD, permite aumentar las predicciones referentes a la posible presencia de sitios alostéricos en la glutaminasa para nucleótidos de adenina, hechas a partir de su estabilidad en presencia del ADP durante los dializados. El pegado de la glutaminasa al Cibacrón azul sugiere fuertemente la presencia de sitios de reconocimiento entre la glutaminasa y el NAD.

Una variante al proceso de elusión, fue el de incluir en el gradiente de sales, un gradiente simultáneo de glutamina, a fin de observar si la elusión era más selectiva y que la presencia del sustrato de la glutaminasa pudiera ejercer mayor poder de estabilización, lo que no se logró obtener.

Es importante considerar que los rendimientos se pueden mejorar si se incluyen agentes estabilizadores como mayor concentración de DTT y glutamina, proteínas conocidas

que pudieran estabilizar por su sola presencia, tales como la albúmina, o la inclusión de glicerol en el amortiguador de resuspendido de la enzima pura, etc.

La gran afinidad del Cibacrón azul por la glutaminasa, permite considerar la posibilidad de establecer un protocolo de purificación mucho más corto y probablemente más eficiente para la purificación a gran escala de la enzima.

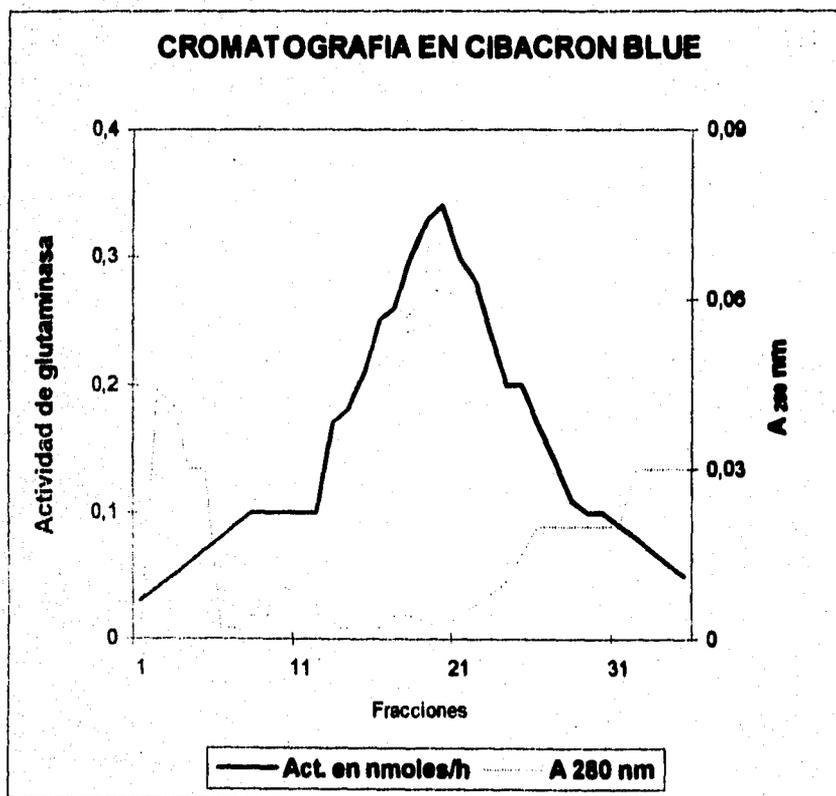


Figura 9. Patrón de elusión de la glutaminasa en cromatografía de ligando colorante Cibacrón azul.

PROTOCOLO DE PURIFICACION DE LA GLUTAMINASA TERMOLABIL DE *Rhizobium etli*

El protocolo de purificación de la glutaminasa termolábil de *Rhizobium etli* quedó establecido de la manera que sigue:

1. Inoculación de cajas de PY sólido con los antibióticos Nalidixico y Tetraciclina con la cepa CE3pCD24 de *R etli*. Incubar 3 días a 30 °C.

2. Inoculación de matraces de 100 ml de PY líquido NaI-Tc (uno por cada fermentador a utilizar) con el crecimiento de la cepa CE3pCD24 en caja. Se inoculan dos matraces por caja. Incubar los matraces a 30 °C y 200 rpm de agitación de 8 a 10 horas.

3. Inoculación de fermentadores con medio mínimo glutamina-succínico-Tc, con la cepa crecida en PY, ajustando a una $DO_{540\text{nm}}$ de 0.05. Incubar de 14 a 16 horas.

4. Obtener células por centrifugación (10 minutos, 10 krpm), lavado y resuspendido en amortiguador KP 0.1 M (amortiguador KP: KH_2PO_4 + 5 mM glutamina + 0.5 mM DTT, pH 8), a 4°C.

5. Sonicar cada 10 ml del extracto 10 minutos a 14-18 ciclos. El sonicado debe hacerse en hielo. Centrifugar 10 minutos a 12 krpm, decantar y conservar el sobrenadante. Desechar el botón.

6. Precipitar el sobrenadante obtenido con $(NH_4)_2SO_4$ al 20 % (peso/vol), homogeneizar en agitación constante 30 minutos a 4 °C. Centrifugar 10 minutos a 12 krpm. Decantar y precipitar nuevamente el sobrenadante al 35 % de $(NH_4)_2SO_4$ (agregando un 15 % más). Homogeneizar en agitación constante 30 minutos a 4 °C. Centrifugar 10 minutos a 12 krpm. Decantar y conservar el precipitado, que se resuspende en amortiguador KP 0.1 M. Dializar toda la noche el resuspendido en 1 litro del mismo amortiguador, a 4 °C.

7. El dializado se aplica a DEAE-celulosa previamente equilibrada con amortiguador KH_2PO_4 0.05 M. Se lava con amortiguador KP 0.1 M y eluir en gradiente lineal 0.1 M vs 1 M de amortiguador KP. Colectar fracciones con actividad, mezclarlos y precipitar con $(NH_4)_2SO_4$ al 50 %. Resuspender el precipitado y dializarlo en amortiguador KP 0.2 M toda la noche, a 4 °C.

8. Dializar 1 hora el precipitado de DEAE en amortiguador KP 1 M a temperatura ambiente. Aplicar a Octyl-agarosa previamente equilibrada con el mismo amortiguador. Lavar con el mismo amortiguador y eluir en gradiente KP 1 M vs H_2O . Colectar fracciones con

actividad, precipitar al 50 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Resuspender el precipitado y dializarlo en amortiguador KP 0.2 M toda la noche a 4 °C.

9. El dializado se aplica a Sephacryl S200 previamente equilibrado en amortiguador KP 0.2 M. Se eluye con el mismo amortiguador y se colecta y mide el volumen de elución. Se colectan las fracciones con actividad, se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50 %, se resuspende el precipitado y se dializa en amortiguador KP 0.1 M toda la noche a 4 °C.

10. El dializado se aplica a Cibacrón blue previamente equilibrado con amortiguador KP 0.1 M, a temperatura ambiente. Se lavar con el mismo amortiguador y se eluye en gradiente lineal 0.1 M vs 1 M de amortiguador KP. Se colectan las fracciones con actividad, y se precipitan al 50 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se resuspende el precipitado y se dializa contra amortiguador 0.2 M KP toda la noche, a 4°C. Almacenar el dializado a -70 °C.

En la tabla 6 se presentan los resultados del protocolo de purificación anterior.

Tabla 6. Purificación de la glutaminasa termolábil de *Rhizobium etli*.

ETAPA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL	RENDIMIENTO (%)
Extracto crudo	397	19100	77416	100
Amortiguador	693	10000	65069	84
Sephacryl	1884	10000	20504	26
Cibacrón blue	7746	10000	29139	38
Sephacryl	22000	10000	7700	10
Cibacrón blue	23040	10000	230	0.3

Actividad específica expresada en nmoles/mgP/min.

Proteína total expresada en mg.

F = Factor de purificación.

ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

Para la determinación del grado de pureza de la enzima, así como de las subunidades que integran a la glutaminasa, se llevó a cabo la electroforesis en gel desnaturizante SDS-poliacrilamida, con los resultados siguientes:

Se calculó la movilidad relativa de los marcadores de masa molecular cercanos a la banda de glutaminasa que se va enriqueciendo conforme a los pasos de purificación, a fin de determinar la masa molecular de las subunidades que integran a la glutaminasa:

R_f = distancia de migración de la proteína / distancia del frente de corrida.

$$R_f \text{ pepsina} = 3.9 \text{ cm} / 9.9 \text{ cm} = 0.39$$

$$\text{MM pepsina} = \pm 34.7 \text{ kDa}$$

$$R_f \text{ tripsinógeno} = 6.2 \text{ cm} / 9.9 \text{ cm} = 0.62$$

$$\text{MM tripsinógeno} = \pm 24 \text{ kDa}$$

$$R_f \text{ GLUTAMINASA} = 5.9 \text{ cm} / 9.9 \text{ cm} = 0.59$$

$$\text{MM glutaminasa} = \pm 24.5 \text{ kDa}$$

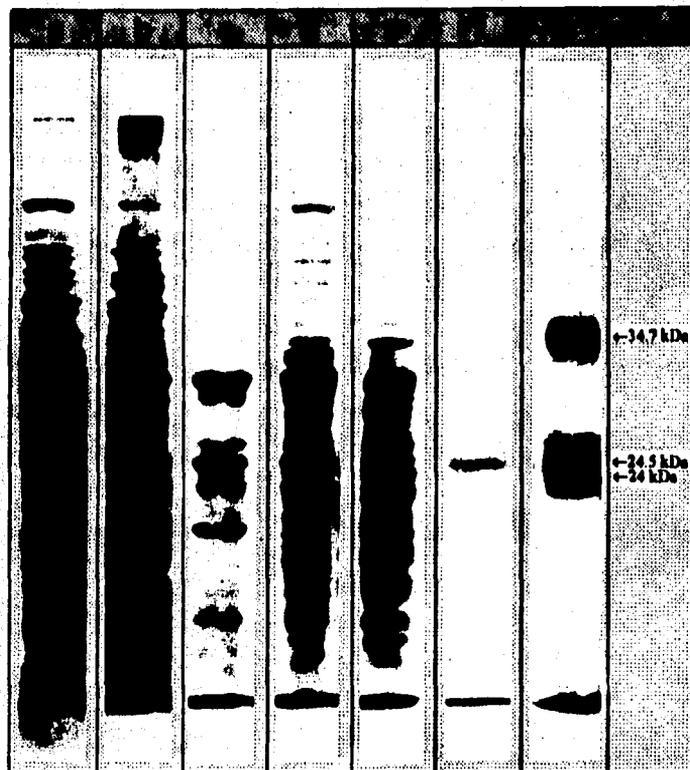
Se observa un enriquecimiento gradual de una banda de 24.5 kDa aproximadamente, que migra muy cercana al marcador de masa molecular de 24 kDa (tripsinógeno).

Los monómeros de la glutaminasa presentan una masa molecular aproximada de 24.5 kDa, mientras que la masa molecular de la glutaminasa en su estado nativo es de ± 90 kDa, obtenida por filtración en gel.

Esta relación permite proponer que la glutaminasa presenta 4 subunidades idénticas, que se separan en gel desnaturizante SDS-PAGE (Fig. 10).

En el gel se puede observar la alta pureza que se logra en el último paso de purificación de la glutaminasa, con Cibacrón azul, donde se observa una banda muy tenue debido a la cantidad tan pequeña de enzima recuperada. También se ven otras bandas sumamente tenues, que permiten afirmar que el grado de pureza obtenido para la glutaminasa está muy cercano a la homogeneidad.

La diferencia entre las masas moleculares obtenidas para la enzima en su estado nativo y para las subunidades que la integran, presentan pequeña variación, ya que si se considera que 4 monómeros idénticos integran a la glutaminasa, la masa molecular de la misma se espera de 90 a 100 kDa, resultado que se obtuvo en filtración en gel.



- a) Extracto crudo. b) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
 c) DEAE-celulosa. d) Octyl agarosa.
 e) Sephacryl. f) Cibacrón azul.
 g) Marcadores de masa molecular.

Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los diferentes pasos de purificación de la glutaminasa termolábil de *R. etli*.

DISCUSION

La glutamina es un compuesto clave en el metabolismo de nitrógeno, ya que sirve como donador de N_2 en una gran variedad de vías biosintéticas (Stadtman, 1973) y es considerada como corresponsor del catabolismo nitrogenado (Halpern, 1988), porque de su concentración depende la velocidad de degradación y síntesis del nitrógeno celular y la utilización del nitrógeno del medio.

La glutamina y el glutamato son los donadores universales del nitrógeno celular, de su equilibrio depende la óptima distribución del nitrógeno celular.

Las glutaminasas son enzimas que catalizan la desamidación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio. Nosotros estamos interesados en estudiar los mecanismos que regulan la actividad catalítica de estas enzimas en *R. etli*, que es una bacteria que fija nitrógeno.

En *R. etli* (Durán y Calderón, 1995), la glutamina es sintetizada por las GS a partir de glutamato y amonio, y degradada por vías diferentes: la transaminasa de glutamina- α -amidasa, que es importante en la síntesis irreversible de glicina y alanina y mantiene el balance entre estos aminoácidos; la GOGAT, que sintetiza glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato, que puede participar en el balance entre glutamina y glutamato; y la glutaminasa, enzima que se presenta con la más alta actividad catalítica en *R. etli*, en todas las condiciones de crecimiento probadas.

La glutaminasa juega un papel central en la utilización de la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y en mantener el balance entre glutamina y glutamato. La mutante LM16, alterada en la actividad de glutaminasa no puede crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y presenta en sus pozas de aminoácidos acumulación de glutamina y baja cantidad de glutamato respecto a la cepa silvestre. La glutaminasa participa en el ciclo de la glutamina, donde este aminoácido es continuamente degradado y resintetizado. Los bacteroides de la mutante LM16 alterada en la actividad de glutaminasa acumulan glutamina y presentan pozas bajas de glutamato, lo que sugiere que la glutaminasa puede tener un papel importante en la simbiosis. Una triple mutante de GS de *R. meliloti* nodula y fija nitrógeno, lo que sugiere que la planta le proporciona glutamina a los bacteroides, por lo que la actividad de las glutaminasas presenta una importancia excepcional.

Existen evidencias que sugieren la presencia de isoenzimas de glutaminasa en *R. etli*, una termolábil y una termoestable, que presentan diferente movilidad electroforética (Sánchez y Calderón, 1995, comunicación personal). La glutaminasa termolábil parece ser inducible, ya que al crecer a la bacteria en glutamina se presenta elevada y en amonio succínico se encuentra más baja, por lo que se propone que su principal función es la de degradar la glutamina para utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno; mientras que la glutaminasa termoestable parece ser constitutiva, porque no cambia en las diferentes condiciones de crecimiento, por lo que se propone que puede tener una mayor importancia en la regulación de las concentraciones de glutamina y glutamato y en el ciclo.

Se llevó a cabo la purificación parcial de las glutaminasas de *Rhizobium etli*. Se decidió purificar parcialmente ambas isoenzimas, porque simultáneamente al desarrollo de este trabajo, se detectó la probable presencia de este par de isoenzimas de glutaminasa.

Para la purificación de la glutaminasa termolábil se utilizó la cepa silvestre de *R. etli* CE3 con el plásmido pCD24, que contiene el gen de la glutaminasa termolábil y que presenta tres veces más actividad de glutaminasa que la cepa silvestre; y la mutante LM16 que sólo presenta actividad de glutaminasa termoestable.

Se determinaron las condiciones que confieren estabilidad a la glutaminasa: alta fuerza iónica en el amortiguador de extracción y dializado (0.1 M, 0.2 M o más alto); pH 8 y baja temperatura; presencia de su sustrato, la glutamina, que estabiliza la actividad de la enzima al ocupar el sitio catalítico; presencia de agentes antioxidantes durante la extracción y el proceso de purificación (dithiothreitol), lo que sugiere que la glutaminasa presenta en su estructura molecular grupos susceptibles a oxidación (sulfhidrilos) que le confieren una estructura tridimensional adecuada para su actividad, o bien, participan en el reconocimiento y formación del complejo enzima-sustrato; presencia de ADP en dializados, lo que sugiere que la glutaminasa presenta sitios alostéricos para ésta y otros nucleótidos de adenina, que pueden participar en la modulación de su actividad catalítica *in vivo*. La interacción específica de la resina Cibacrón Blue y la glutaminasa durante el proceso de purificación, también sugiere que dichos metabolitos energéticos pueden tener sitios de reconocimiento en la glutaminasa, pues su estructura tridimensional es similar al NAD.

Se observó que los cationes divalentes no la modulan como en el caso de la glutaminasa B de *E. coli*, y que el glutamato presentó una importante influencia en el estabilizado de la actividad de la glutaminasa, atribuible a que, por ser un producto de la catálisis de la glutamina, en la estructura de la enzima debe existir un sitio de reconocimiento

para el glutamato, muy cercano al sitio catalítico, que al ocuparse confiere estabilidad a la enzima.

De los resultados anteriores, se estableció la utilización de un amortiguador KH_2PO_4 con 5 mM de glutamina y 0.5 mM de dithiothreitol (amortiguador KP), de diferentes molaridades para los pasos de purificación estandarizados.

Se estableció el protocolo de purificación siguiente para la glutaminasa termolábil de la cepa CE3pCD24:

Precipitación con sulfato de amonio, donde se obtiene un rendimiento cercano al 85 % y un factor de purificación cercano a 2. La solubilidad de la glutaminasa se considera media, ya que precipita entre un 20 y 35 % de saturación de sulfato de amonio. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, donde se observó un rendimiento superior al 25 %, con un factor de purificación entre 4 y 5. La glutaminasa termolábil presenta carga negativa a pH 8 y en las condiciones de fuerza iónica de 0.05 a 0.1 M del amortiguador KP. Cromatografía de interacción hidrofóbica en Octyl-agarosa, cuyo factor de purificación fue de 19.5 con un rendimiento del 25 %. Los resultados sugieren que la glutaminasa presenta zonas hidrofóbicas externas importantes en su estructura tridimensional, que interaccionan con los grupos Octyl de la resina. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, en Sephacryl S200, cuyo rendimiento fue de un 10 % con un factor de purificación cercano a 56. Esta resina permitió determinar la masa molecular de la enzima en su estado nativo. El último paso de purificación fue en la resina Cibacrón azul, la cual fue la de mayor especificidad, en que se lograron rendimientos del 0.3 %, con un factor de purificación por encima de 56. La estructura tridimensional del Cibacrón azul, similar al NAD apoya la sugerencia de que existen sitios alostéricos en la glutaminasa para nucleótidos de adenina, como el ATP, ADP, AMP, NAD, que permitieron su interacción con la resina, con lo que se logró una separación altamente específica.

La glutaminasa termolábil se purificó cercana a la homogeneidad, con una actividad específica de 23 $\mu\text{moles/mgP}\cdot\text{min}$. Presenta una masa molecular de ± 90 kDa en su estado nativo, obtenido por filtración en gel, con monómeros de ± 24.5 kDa, obtenidos en SDS-PAGE.

Los resultados obtenidos en la purificación de la glutaminasa termolábil de *R etli*, nos permite compararla con las glutaminasas de otros modelos biológicos, encontrando gran similitud en cuanto a masa molecular con las glutaminasas de *E coli*, donde la glutaminasa A es de 110 kDa y la glutaminasa B es de 90 kDa; ambas glutaminasas son moduladas por nucleótidos de adenina, lo que también se sugiere para la glutaminasa de *R etli*. Las

glutaminasas de mamífero son mucho mayores y con un número de subunidades más alto que el encontrado en la glutaminasa de *R. etli*; ambas se diferencian por su sensibilidad al glutamato, lo que se espera encontrar para las glutaminasas de *R. etli*.

La glutaminasa termoestable, de la cepa LM16, se ha enriquecido aproximadamente 6 veces, con sólo dos pasos de purificación: sulfato de amonio y DEAE-celulosa. La glutaminasa termoestable presenta una solubilidad similar a la de la glutaminasa termolábil y el mismo patrón de elusión en la resina de intercambio iónico, lo que sugiere que ambas presentan características muy similares.

Los resultados obtenidos en la purificación de la glutaminasa termolábil, pueden ser mejorados en tanto se logren elevar los rendimientos, por lo que es necesario probar diferentes condiciones para aumentar la estabilidad de la glutaminasa pura, como la inclusión de proteínas como la albúmina o compuestos como glicerol, que confieran estabilidad a la enzima, o bien, aumentar la concentración del antioxidante conforme la pureza de la enzima aumente, reduciendo la posibilidad de oxidación. También se propone la reducción de pasos en el protocolo de purificación, ya que se observó que la resina Cibacrón azul se comportó de una manera muy específica, lo que permite suponer que podemos purificar a la glutaminasa con dos o tres pasos, incluido éste, con lo que será posible manejar volúmenes mucho mayores de la enzima en tiempos más cortos.

Con la optimización del protocolo de purificación de la glutaminasa termolábil y el establecimiento de un protocolo de purificación completo para la glutaminasa termoestable, se estará en la posibilidad de caracterizarlas bioquímicamente y con técnicas inmunológicas, para conocer los mecanismos de regulación que operan en estas enzimas centrales del metabolismo nitrogenado y que controlan su actividad catalítica, con lo que se podrá establecer más claramente el papel metabólico de cada una de ellas en *Rhizobium etli*.

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones que confieren estabilidad a las glutaminasas de *Rhizobium etli*.

Se lograron determinar las condiciones de almacenado de la enzima, en que la actividad de la misma se conserva en un 100 %.

Se estableció un protocolo de purificación para la glutaminasa termolábil, con el cual se purificó cercana a la homogeneidad.

La glutaminasa termolábil presenta una masa molecular en su estado nativo de ± 90 kDa, con subunidades idénticas de ± 24.5 kDa.

La glutaminasa termoestable de la cepa LM16 se enriqueció aproximadamente 8 veces, con sólo dos pasos de purificación.

PERSPECTIVAS

El establecimiento de un protocolo de purificación de las glutaminasas permitirá continuar con su caracterización bioquímica e inmunoquímica, con lo cual se podrán determinar los mecanismos reguladores de la actividad catalítica de las glutaminasas, tales como la modulación alostérica y la probable presencia de modificaciones estructurales postranscripcionales; asimismo se podrán determinar los parámetros cinéticos de las glutaminasas, a fin de conocer su afinidad por glutamina y su operatividad, es decir, las condiciones metabólicas en que se encuentran operando cada una de ellas, con lo cual se podrá establecer de manera más clara el papel metabólico de las mismas.

La posibilidad de producir anticuerpos policlonales contra las glutaminasas purificadas permitirá utilizar a éstos como una herramienta para determinar la presencia de glutaminasas en otras Rhizobiáceas y con ello, conocer el grado de semejanzas bioquímicas e inmunoquímicas entre las mismas.

REFERENCIAS

- Alexander, M. (1981). Introduction to soil microbiology. John Willey and Sons, Inc. New York. 277-302.
- Arwas, R., McKay, Y., Rowney, F., Dilworth, M. y Glenn, A. (1985). Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **1313**: 2059-2066.
- Bastarrachea, F., Osorio, A., Camarena, L., Salazar, G. y Noll-Louzada, M. (1993). Nitrogen regulation in an *Escherichia coli* strain with a temperature sensitive glutamyl-tRNA synthetase. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 400-408.
- Belser, L. (1979). Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**: 309-312.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *R. leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- Bradford, H. F. y H. K. Ward. (1976). On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. *Brain Res.* **110**: 115-125.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bravo, A. y J. Mora. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* **170**: 980-984.
- Burguess, B. K. (1985). Nitrogenase mechanism: an overview. In *Nitrogen Fixation Research Progress*. Newton et al Eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 543-550.
- Calderón, J., Cooper, A., Gelbard, A. y J. Mora. (1989). ¹³N isotope studies of glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **171**: 1772.
- Calderón, J. y L. M. Martínez. (1993). Regulation of ammonium ion assimilation enzymes in *Neurospora crassa* nit-2 and ms-5 mutant strains. *Biochem. Gen.* **31**: 9/10.
- Calderón, J. y J. Mora. (1985). Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3237.
- Calderón, J. y J. Mora. (1989). Glutamine assimilation pathways in *Neurospora crassa* growing on glutamine as sole carbon and nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2699-2707.

Calderón, J., Du Pont, G., Durán, S., Peralta, H. y Huerta, A. (1994). El metabolismo de nitrógeno y carbono en *Rhizobium* en vida libre y en simbiosis con leguminosas. 'Memorias V Congreso de Biotecnología. Tomo S. 208-223.

Callaham, D. y Torrey, J. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**: 1647-1664.

CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1987). Informe CIAT. Programa de Frijol. Cali, Colombia. 39-55.

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York, USA. 598-602.

Curthoys, N., Kuhlenschmidt, T. y S. Godfrey. (1976). Regulation of renal ammoniogenesis. Purification and characterization of phosphate-dependent glutaminase from rat kidney. *Arch. Biochem. and Biophys.* **174**: 82-89.

Curthoys, N., Kuhlenschmidt, T., S. Godfrey y R. Weiss. (1976). Phosphate-dependent glutaminase from rat kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**: 162-167.

Chaney, A. L. y Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**: 130-132.

Dazzo, F. B. y Gardiol, A. (1984). Host specificity in *Rhizobium*-legume interactions. In *Genes involved in microbe plant interactions*. New York Springer Publisher. 3-31 pp.

Dilworth, M. y A. Glenn. (1984). How does a legume nodule work?. *TIBS*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Holland. 519-523.

Du Pont, G. (1994). Clonación del locus que complementa a una mutante de *Rhizobium phaseoli* alterada en el catabolismo de glutamato y la fijación de nitrógeno. Tesis de Licenciatura en QFB. UNAM, México. 95pp.

Duncan, M. y Fraenkel, D. (1979). 2-oxoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **137**: 415-419.

Durán, S. C. (1994). La asimilación de la glutamina en *Rhizobium etli*. Tesis de Maestría en IBB. UNAM, México. 63pp.

Durán, S. C. y J. Calderón. (1995). Role of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology.* **141**: 589-595.

Durán, S. G., Du Pont, A. Huerta-Zepeda y J. Calderón. (1995). The role of glutaminase in *Rhizobium elii*: studies with a new mutant. Microbiology. En Prensa.

Elliot, E. y Coleman D. (1977). Soil protozoan dynamics in a shortgrass prairie. Soil. Biol. Biochem. 9: 113-115.

Esau, K. (1987). Anatomía de las plantas con semilla. Hemisferio Sur, Uruguay. 512 p.

Finan, T., Wood, J. y Jordan D. (1983). Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 154: 1403-1413.

Flores-Samaniego, B. H. Olivera y A. González. (1993). Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. (175): 23, 7705-7706.

Gardiol, M., Arias, A., Cervansky, C. y Martínez-Drets, G. (1982). Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 151: 1621-1623.

Halpern, Y. S. (1988). Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In *Nitrogen source control of microbial processes*, pp 21-58. De. S. Sánchez-Esquivel. Boca Ratón. CRC Press.

Hardy, R. y Havelka, U. (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in plants*, Vol 7. International Biology Programmer Series. Cambridge University Press, London. UK. 421-439.

Hartman, S. y T. McGrath. (1973). Glutaminase A of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248: 24-27.

Heini, H., Gebhardt, R., Brecht, A. y Mecke, D. (1987). Purification and characterization of rat liver glutaminase. Eur. J. Biochem. 162: 541-546.

Kahn, M., Kraus J. y Somerville. (1985). A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In *Nitrogen fixation Research progress*. Eds. H. J. Evans, P. J. Botton and W. E. Newton. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff. p 193.

Katz, J. y Rognstad R. (1976). Futile cycles in the metabolism of glucose. Curr. Top. Cell. Regul. 10: 237-289.

Kretovich, V., Sidel'nikova, L., Ivanushkin, A. y Karyakina, T. (1985). Localization of aspartase, asparaginase, and glutaminase in intact bacteroids of *R. lupini*. Plenum Publishing Co. 362p.

Kretovich, V., Sidel'nikova, L., Ivanushkin, A. y Karyakina, T. (1982). Glutaminase and asparaginase activities of bacteroids from *R. lupini*. Plenum Publishing Co. 616p.

Kvamme, E., Torgner, I. y Roberg, B. (1991). Evidence indicating that pig renal phosphate-activated glutaminase has a functionally predominant external localization in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **266**: 13185-13192.

Lehninger, A. (1978). Bioquímica. Omega. Barcelona, España. 1117pp.

Libbenga, K. y Harkes, P. (1973). Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum*. *Planta* **114**: 17-28.

López, A. y R. Quintero. (1987). Tecnología enzimática. UNAM. México. 178pp.

Lowry, D. Rosenbrough N. y Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193-251.

Márquez, J., Aledo, J., Segura, J., Medina, A., Alonso, F. y Núñez, I. (1994). Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS letters* **341** : 39-42.

McKay, Y. et al. (1989). Carbon catabolism in continuous culture and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. *Arch. Microbiol.* **152**: 606-610.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, USA.

Mora, J. (1990). Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* **54**: 293-304.

Mora, J. Encarnación, S., Calderón, J., Gelbard, A. S. y 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.

Mora, J. y F. Lara. (1988). Nitrogen metabolism: an overview. *In Nitrogen source control of microbial processes*. Ed. Sánchez-Esquivel. CRC Press. 59.

Mortenson, L. y Thornely, R. (1979). Structure and function of nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 387-418.

Nelson, D., Rumsey, W. y Erecinska, M. (1992). Glutamine catabolism by heart muscle. Properties of phosphate-activated glutaminase. *Biochem. J.* **282** : 559-564.

Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis. *In International review of cytology*, 13. De. Boume and Danielli. New York, USA. 246-298.

Nissim, I., Cattano, C., Nissim, I. y M. Yudkoff. (1992). Relative role of the glutaminase, glutamate dehydrogenase, and AMP-deaminase pathways in hepatic ureagenesis. *Arch. Biochem. and Biophys.* **292**: 393-401.

Noel, K. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **158**: 148-155.

Pinkus, L. y H. Windmueller. (1977). Phosphate-dependent glutaminase of small intestine: Localization and role in intestinal glutamine metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**: 506-517.

Prusiner, S. y E. Stadtman. (1973). The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press. New York, USA. 615pp.

Prusiner, S. (1973). Glutaminases of *Escherichia coli*: Properties, regulation and evolution. Prusiner, S. and E. Stadtman Eds. In The enzymes of glutamine metabolism. Prusiner, S. De. Academic Press Inc. 293pp.

Rastogi, V. y R. Watson. (1991). Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **173**: 2879-2887.

Robertson, J., Lyttleton, P., Bullivant, S. y Graystone, G. (1978). Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroids membranes. *J. Cell Sci.* **30**: 129-149.

Rodríguez, C. y M. Porras. (1985). Botánica Sistemática. UACH. México, D. F. 424 p.

Ronson, C., Lyttleton, P. y Robertson, J. (1981). C₄-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 4284-4288.

Ronson, C. y Pimrose, S. (1979). Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii*: identification and symbiotic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 77-88.

Scopes, R. (1988). Protein purification. Springer-Verlag. New York, USA. 329pp.

Segovia, L., Young, P. y E. Martínez. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.

Shapiro, R., Farrel, L., Srinivasan, M. y N. Curthoys. (1991). Isolation, Characterization and *in vitro* expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J. Biol. Chem.* **266**: 18792-18796.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Shapiro, R. G. Haser y P. Curthoys. (1987). Immunoblot analysis of glutaminase peptides in intact and solubilized mitochondria isolated from various rat tissues. *Biochem. J.* **242**: 743-747.
- Smith, E. y M. Watford. (1988). Rat hepatic glutaminase: Purification and immunochemical characterization. *Arch. Biochem. and Biophys.* **260**: 2.
- Smith, E. y M. Watford. (1990). Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. *J. Biol. Chem.* **265**: 18.
- Soberón, M. y A. González. (1987). Physiological role of glutaminase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1.
- Sprent, J. (1987). The ecology of the nitrogen cycle. Cambridge University Press. London, UK. 151-155.
- Stadtman, E. R. (1973). A note on the significance of glutamine in intermediary metabolism. In *The enzymes of glutamine metabolism*, pp 1-6. De. Prusiner y Stadtman. New York. Academic Press.
- Stanley, D. y J. Aguilera. (1985). A review of textural defects in cooked reconstituted legumes. The influence of structure and composition. *J. Food Biochem.* **9**: 277-323.
- Stowers, M. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 61-89.
- Sutton, W., Pankhurst, C. y Craig, A. (1981). The *Rhizobium* bacteroid state. In *International Review of Cytology*. 13. Ed. Bourne and Danielli. New York, USA. 149-177.
- Swierczynski, J., Bereznowsky, Z. y W. Makarewicz. (1993). Phosphate-dependent glutaminase of rat skeletal muscle. Some properties and possible role in glutamine metabolism. *Bioch. and Biophys. Acta.* **1157**: 55-62.
- Verma, D. y Long, S. (1983). Molecular biology of *Rhizobium*-plant symbiosis. In *Intracellular symbiosis*. Ed. Jeon. New York. 211-245.
- William, R., Hoffman, J. y R. Bernlohr. (1981). Occurrence of an inducible glutaminase in *B. licheniformis*. *J. Bacteriol.* **148**: 365-367.
- Yao, P. Y. y Vincent, J. (1969). Host specificity in the root air "curling factor" of *Rhizobium* sp. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**: 413-423.