

CFN. 31
TD
1989
25.1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Centro de Investigación sobre
Fijación de Nitrógeno

El Reciclaje de la Glutamina en
Neurospora crassa

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica

Presenta el Maestro:

Jorge Fernando Calderón Jiménez

México, D. F.

1989



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.

A mis padres, por su invaluable ayuda
y apoyo constante

A mis hermanos, familiares, y amigos

A mis compañeros del Depto. de Ecología Molecular

A Gisela, Estefanía y

les dedico esta tesis con mucho cariño.

Al Dr. Jaime Mora le reitero
mi reconocimiento a sus valiosas
enseñanzas y afectuoso estímulo.

Agradezco:

A Leticia Olvera y Luz María Martínez
su valiosa colaboración.

Ma. Esther Wolburg por la
transcripción de esta tesis.

Porqué contentarnos con vivir
a rastras cuando sentimos
el anhelo de volar.

Helen A. Keller

Indice

Introducción	1
Objetivo	17
Resultados	20
^{13}N Isotope Studies of Glutamine Assimilation	
Pathways in <u>Neurospora crassa</u>	21
Glutamine Assimilation Pathways in <u>Neurospora</u> <u>crassa</u> Growing on Glutamine as Sole Nitrogen and Carbon Source	24
Discusión	33
Referencias	45

Introducción

Después del carbono, el hidrógeno y el oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en los sistemas vivos; sin embargo, junto con el fósforo, es el que se encuentra en menor cantidad en la corteza terrestre. Es así, que los microorganismos y las plantas han desarrollado una serie de estrategias para buscar el nitrógeno y asimilarlo. Estas estrategias se traducen en diferentes procesos que comprenden la forma de buscarlo, incorporarlo a la célula, metabolizarlo para convertirlo en amonio, asimilarlo en glutamato y glutamina, distribuir el nitrógeno presente en estos aminoácidos a través de enzimas que transaminan y transamidán, acumularlo en organelos específicos, sintetizar macromoléculas y finalmente degradar el nitrógeno celular para reciclarlo otra vez a amonio (1).

La asimilación de amonio lleva a la síntesis de glutamato y glutamina, que es donde converge y diverge el metabolismo nitrogenado. La utilización de cualquier compuesto nitrogenado del medio, conlleva siempre a su conversión a amonio y por otro lado, el nitrógeno celular continuamente es reciclado a amonio (1). Es también, durante la asimilación de amonio, donde el metabolismo de nitrógeno y de carbono se unen a través de proporcionar este último esqueletos de carbono, poder reductor y energía, indispensables para la asimilación de amonio. Debido a lo anterior, el proceso de la asimilación de amonio es un punto clave del metabolismo celular donde se controla el resto de los procesos del metabolismo nitrogenado (1). El amonio asimilado en glutamato y

glutamina se distribuye a todos los compuestos celulares nitrogenados por reacciones de transaminación y transamidación.

La deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH-NADPH) y la glutamino sintetasa (GS) son las únicas enzimas capaces de incorporar el amonio a moléculas orgánicas en microorganismos. La GDH-NADPH cataliza la reacción para sintetizar glutamato a partir de α -cetoglutarato, NADPH y amonio. La GS sintetiza glutamina a partir de glutamato, amonio y ATP.

La GDH-NADPH de Neurospora crassa es un hexámero constituido por subunidades iguales con un peso molecular de 48,000 daltones (2). Los estudios de Fincham y colaboradores (3,4,5,6,7,8), han establecido su estructura oligomérica y su secuencia de aminoácidos; han demostrado una aparente correlación entre los sitios de diferentes mutaciones puntuales y la posición de los aminoácidos en el polipéptido, y han clonado el gene estructural de la GDH-NADPH de N. crassa. La actividad de la GDH-NADPH es ligeramente menor cuando se usa glutamato o glutamina como fuente de nitrógeno que cuando se usa amonio (9). Fincham y colaboradores han descrito mutantes que carecen de la actividad de la GDH-NADPH, estas mutantes en comparación con la cepa silvestre presentan una baja velocidad de crecimiento en amonio como fuente de nitrógeno, mientras que la velocidad de crecimiento es casi igual a la de la cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (10). Estos datos indican que la GDH-NADPH se requiere principalmente para asimilar el amonio cuando éste se encuentra en exceso.

En N. crassa existe otra glutamato deshidrogenasa que utiliza

NAD como cofactor (GDH-NADH), a la cual se le ha dado una función catabólica y cataliza la formación de 2-oxoglutarato y amonio a partir de glutamato (11). Esta enzima está sujeta a la represión catabólica por carbono (11).

La GS de N. crassa está formada por dos monómeros denominados α y β . Los monómeros α (GS α) se constituyen principalmente en un tetrámero, mientras que los monómeros β (GS β) forman un octámero (11). Tanto los monómeros α como los β tienen un peso molecular de 48000 daltones y se pueden separar electroforéticamente en un gel de acrilamida con SDS-urea, siendo el polipéptido β el que migra más rápido de los dos (13). Se ha encontrado que la expresión de estos monómeros y la forma oligomérica en la que se estructuran, varían según la cantidad de amonio disponible. Así, en exceso de nitrógeno, el oligómero de la GS que predomina es un octámero compuesto principalmente por monómeros β (10). En cultivos limitados de amonio se encuentra un tetrámero de GS (14) compuesto principalmente de monómeros α (12). También se ha encontrado la presencia de dos monómeros de la GS en formas oligoméricas intermedias entre el tetrámero y el octámero (12). Se ha demostrado que la síntesis in vivo del polipéptido α o β corresponde a una diferente concentración de mRNA específico (15). Hay evidencia experimental que indica que probablemente los polipéptidos α y β son codificados por dos mRNA's diferentes (15).

La GS de Neurospora ha sido caracterizada genéticamente al estudiarse diferentes auxótrofos de glutamina. Se han reportado mutantes auxótrofas que muy probablemente mapean en el gene

estructural del polipéptido β (16). Un tipo de estas mutantes son auxótrofos parciales de glutamina, ya que son capaces de crecer con glutamato como fuente de nitrógeno a 37°C , pero no a 25°C. Estas poseen un monómero α de la GS igual al de la cepa silvestre, carecen del monómero β y presentan un nuevo polipéptido (γ) de menor peso molecular, que se puede explicar como producto de una mutación en el gene estructural del polipéptido β (16). Además se obtuvieron, a menor frecuencia, mutantes que sólo crecen en glutamina, éstas presentan un polipéptido β alterado en su punto isoeléctrico (16). Se ha propuesto que el polipéptido (γ) alterado bloquea la actividad del polipéptido α de la GS participando en la formación de oligómeros híbridos anormales y no funcionales (16). Este tipo de mutantes se han obtenido con baja frecuencia, probablemente debido a que muy pocas mutaciones sencillas en el gene de la GS β podrían dar un fenotipo tan complejo para dar la auxotrofia (16).

Las cepas revertantes obtenidas, a partir de los auxótrofos de glutamina, sólo sintetizan el monómero α de la GS que se estructura en un tetramero y les permite crecer en amonio como fuente de nitrógeno (16). A partir de estas revertantes, se han aislado mutantes resistentes a un inhibidor de la GS, la L-metil-metionina sulfoximina que dan como resultado un cambio estructural en el polipéptido α de la GS que las hace resistentes a este inhibidor y cambia sus propiedades catalíticas (J. Calderón, L.M. Martínez y J. Mora, sometido a publicación). Esta mutación mapea en un lugar diferente de las mutaciones en el gene β de la GS, lo que indica que la GS α y la GS β son codificadas por diferentes

genes y que no existe entre ellas una relación precursor-producto.

La GS está altamente regulada y ésta ocurre a varios niveles. La calidad de la fuente de nitrógeno regula a la GS, así, en glutamato como fuente de nitrógeno hay mayor actividad y concentración de la enzima que en glutamina (17). Se demostró que esta diferente concentración de la enzima es el resultado de la alteración en su velocidad de síntesis, permaneciendo constante su velocidad de degradación (18) y que las diferencias en velocidades de síntesis obedecen a cambios en la concentración del RNA mensajero específico para esta enzima (19). La GS de N. crassa también es regulada por la fuente de carbono, así se ha reportado que cuando el micelio de N. crassa se cultiva en ausencia de fuente de carbono, la GS se degrada, esto se propuso como un mecanismo regulador para conservar energía (20).

La glutamina y otros productos finales de la transamidación de la glutamina regulan alostéricamente los monómeros α y β de la GS (Guzmán J. y Mora J., en preparación).

Se ha demostrado que los monómeros α y β de la GS son inhibidos in vitro por glicina y serina, y que estos aminoácidos inhiben totalmente el crecimiento en glutamato cuando la GDH está ausente (21). Estos aminoácidos ejercen un doble efecto regulatorio; a) inhiben alostéricamente a la GS y por lo tanto, disminuyen las pozas intracelulares de glutamina y b) regulan la síntesis de la GS al inducir preferencialmente la síntesis del polipéptido β (21). Se ha obtenido una mutante sensible a glicina que presenta una alteración estructural en el polipéptido β de la

GS (16). Se ha propuesto que el doble efecto regulatorio de la glicina y la serina en la síntesis de la glutamina es un mecanismo por el cual se obtiene una relación adecuada entre las pozas de glutamato y glutamina. La inhibición de la GS por estos aminoácidos favorece inicialmente la asimilación de amonio en glutamato y otros aminoácidos. Posteriormente, sin embargo, al disminuir la concentración de la glutamina se induce la síntesis de la GS β , restableciendo la síntesis y recuperando finalmente la poza de glutamina (21).

La modificación oxidativa de la GS parece ser otro mecanismo que participa en la regulación de la actividad de esta enzima en N. crassa. Se ha reportado que la oxidación de los polipéptidos α y β de la GS inactiva a la enzima, dando origen a dos polipéptidos ácidos que son más susceptibles a la proteólisis que los polipéptidos no modificados (22).

La glutamina sirve como donador de nitrógeno en una gran variedad de vías biosintéticas (Fig. 1), y además es un correpre-sor del catabolismo nitrogenado en Neurospora crassa. Debido a que la concentración intracelular de la glutamina es el resultado de su síntesis y degradación y que de ello depende la regulación de la expresión genética de un gran número de enzimas del metabolismo nitrogenado, es importante conocer tanto la síntesis de la glutamina, como su asimilación.

Las enzimas que pueden participar en la asimilación de la glutamina son: las transamidadasas, la glutamato sintasa (GOGAT), las glutaminasas, la vía de la transaminasa de glutamina- α -amida-sa y la L-aminoácido oxidasa.

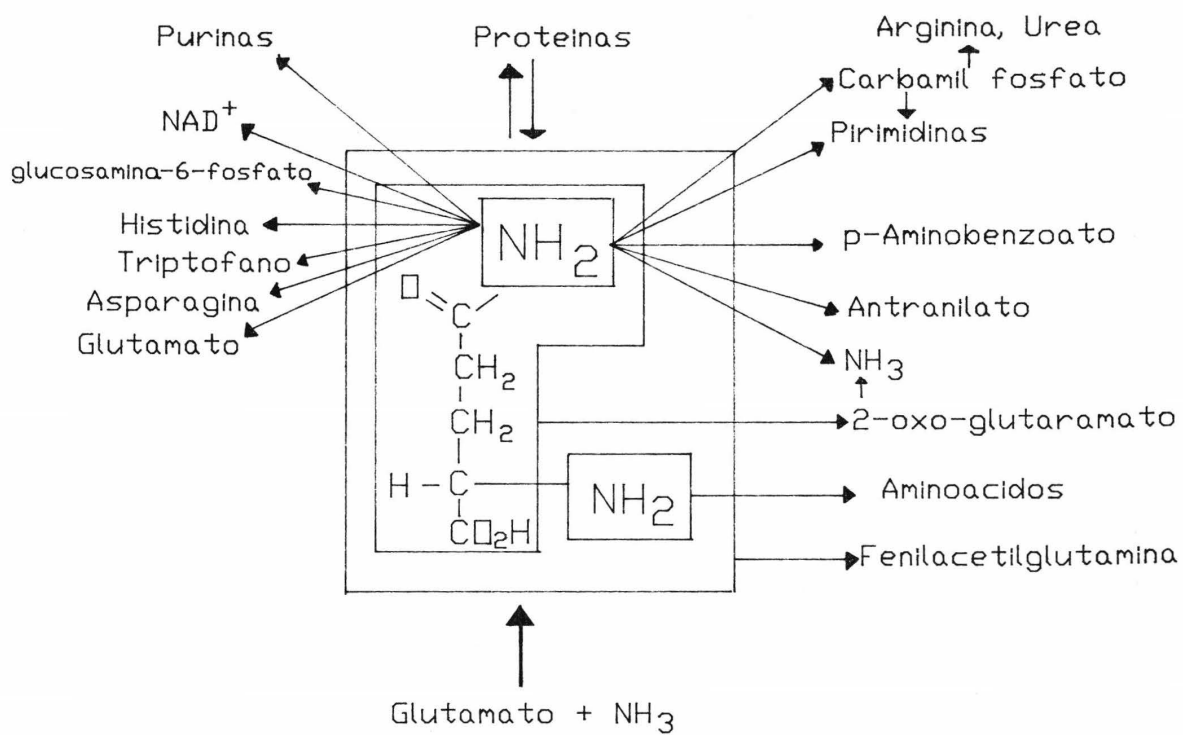


Fig. 1

Las transamidadasas son enzimas que catalizan la donación del grupo amido de la glutamina a un aceptor, dando como productos el aceptor con un grupo amino y ácido glutámico. La mayoría de estas transamidadasas utilizan ATP. Así, el átomo amido de la glutamina es usado para la síntesis de los átomos de nitrógeno 3 y 9 del anillo de purina, los grupos aminos de la glucosamina, guanina, citosina, ácido p-aminobenzoico, el átomo de nitrógeno de carbamilo fosfato (que es utilizado para la síntesis de la arginina y el átomo de nitrógeno 1 del anillo de pirimidinas), el átomo de nitrógeno 1 del anillo del imidazol de histidina y el átomo de nitrógeno del pirrol del triptofano (23).

La transamidasa más estudiada es la carbamilo fosfato sintetasa de Escherichia coli (24,25), esta enzima tiene un peso molecular de 163,000 daltones y está compuesto por dos subunidades, una subunidad pesada de peso molecular de 130,000 daltones y una subunidad ligera de un peso molecular de 40,000 daltones. La subunidad pesada tiene los sitios de unión para amonio, bicarbonato, ATP y los efectores alostéricos UMP, IMP, ornitina y amonio. La subunidad ligera tiene el sitio de unión para el grupo γ -glutamilo de la glutamina. Aparentemente las dos subunidades contribuyen a la unión de la glutamina debido a que la subunidad ligera, por separado, tiene una baja afinidad por glutamina. Cuando las subunidades están separadas, la subunidad pesada es capaz de catalizar la síntesis de carbamilo fosfato a partir de amonio, pero no a partir de glutamina. La subunidad ligera cataliza la hidrólisis de la glutamina. Los aspectos estructurales y funcionales descritos para la carbamilo fosfato sintetasa respecto al

sitio de unión a la subunidad ligera son características generales de las transamidasa (26). Así, parece que el grupo amido de la glutamina se une a un sitio que se encuentra cerca de otro que une amonio (26).

La glutamato sintasa (GOGAT) es una transamidasa que cataliza la transamidación reductiva de la glutamina con el 2-oxoglutarato para dar 2 moléculas de glutamato, esta enzima sólo se encuentra en microorganismos y plantas. El hecho de que mutantes de Bacillus subtilis, que carecían de la actividad de glutamato deshidrogenasa y de alanina deshidrogenasa, crezcan en un medio mínimo (27) y de que en Aerobacter aerogenes la síntesis de glutamato deshidrogenasa puede estar totalmente reprimida sin afectar la capacidad de este microorganismo para asimilar amonio (28), llevó a la demostración de que existe otra vía para asimilar amonio. En esta vía el amonio es asimilado por la glutamino sintetasa para dar glutamina y después la GOGAT lleva a cabo la transamidación reductiva de este aminoácido, dando dos moléculas de glutamato.

La participación de la GOGAT en hongos filamentosos se demostró por primera vez en Neurospora crassa con base en la observación de que una cepa mutante que carece de la actividad de GDH crece igual que una cepa silvestre en cultivos limitados de amonio (10). La GOGAT de Neurospora crassa se purificó a homogeneidad, está constituida por un sólo tipo de monómeros de peso molecular mayor a 200,000 daltones. La actividad de la GOGAT en un medio con amonio es baja, comparada con la actividad en un medio limitado de amonio y se reprime en glutamato y glutamina

(29). La mayor actividad de la GOGAT se presenta cuando se crece en un medio limitado de amonio. En estudios realizados en mutantes en las vías que participan en la síntesis de glutamato GDH-NADPH y GOGAT en cultivos con exceso de amonio y cultivos continuos limitados de amonio, se concluyó que la GDH-NADPH es la enzima que sintetiza preferencialmente glutamato, tanto en exceso como en limitación de amonio, y que la GOGAT tiene un papel importante en sintetizar glutamato a partir de la glutamina, principalmente en condición de limitación de amonio (30).

Las glutaminasas son enzimas que catalizan la deamidación hidrolítica de la glutamina, dando como productos glutamato y amonio. La actividad de glutaminasa se encuentra en una gran cantidad de microorganismos (31). Las mejor estudiadas son las glutaminasas de Escherichia coli. Estas bacterias tienen dos glutaminasas que se distinguen por su pH óptimo; la glutaminasa A tiene un pH óptimo de 5, mientras que la glutaminasa B tiene un pH óptimo de 7 (32). La actividad de la glutaminasa A aumenta cuando el microorganismo entra en la fase estacionaria en cultivos que contienen una alta concentración de amonio y también cuando se crece a este microorganismo en glutamina como fuente de nitrógeno. Cuando la concentración de amonio es baja, la actividad de esta enzima no aumenta. La glutaminasa B parece ser constitutiva debido a que su actividad no se ve influenciada por la fase de crecimiento, ni por diferentes condiciones nutricionales. La glutaminasa B es inhibida por nucleosidos tri y difosfatados y es activada por nucleosidos monofosfatados (32).

La vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa también puede

participar en la degradación de la glutamina. La transaminasa de glutamina cataliza la reacción de transaminación entre glutamina y muy diversos 2-oxoácidos. El 2-oxoácido de la glutamina (2-oxoglutarato) es hidrolizado por una ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio. La transaminasa de glutamina, a diferencia de otras transaminasas es irreversible in vivo, debido a que uno de los productos de esta reacción, el 2-oxoglutarato, no se acumula porque es hidrolizado por la ω -amidasa (33). El estudio de la transaminasa de glutamina se ha realizado en tejidos de mamíferos y se ha encontrado que en los tejidos de rata hay por lo menos tres diferentes transaminasas de glutamina (34): 1) La transaminasa de glutamina L soluble, cuyos mejores sustratos son la glutamina, la metionina, el 2-oxo- γ -metiolo butirato, el β -mercaptopiruvato y el glioxalato. 2) La transaminasa de glutamina K soluble, cuyos mejores sustratos son: la glutamina, la fenilalanina, y los correspondientes 2-oxoácidos. 3) La transaminasa de glutamina K mitocondrial que difiere de la transaminasa K soluble en ciertas propiedades físicas. Se ha encontrado actividad de transaminasa de glutamina en tejidos de mamíferos (33), en ciertas plantas superiores (35), en bacterias (36), en levaduras (37) y en insectos (38). La actividad de ω -amidasa ha sido encontrada en tejidos de mamíferos, levadura, Escherichia coli, Streptococcus faecalis, hojas de espinacas y hojas de lechuga (33).

Otras enzimas que podrían participar en la degradación de la glutamina son las L-aminoácido oxidasas, que catalizan la desamidación oxidativa de los L-aminoácidos. La L-aminoácido oxidasa de Neurospora crassa es capaz de desaminar oxidativamente

a la glutamina con una actividad 50% menor que la que presenta con la histidina, que es el mejor sustrato de esta enzima (39).

La L-aminoácido oxidasa se encuentra presente tanto en extractos de Neurospora crassa como en el medio de cultivo. La síntesis de esta enzima requiere tanto de la inducción por un aminoácido, así como simultáneamente de la depresión catabólica nitrogenada, por lo que la actividad de esta enzima no se encuentra en exceso de amonio ni en glutamina como fuente de nitrógeno (40). En condiciones de derepresión nitrogenada, la limitación de carbono en presencia de un aminoácido como inductor no permite la inducción de la L-aminoácido oxidasa. Los inhibidores de la síntesis de proteínas y de la síntesis de RNA bloquean la acumulación de la L-aminoácido oxidasa, lo que sugiere que la expresión de esta enzima es controlada a nivel de su transcripción (40).

Cuando a un microorganismo se le da un aminoácido como fuente de nitrógeno, éste debe degradarlo hasta amonio para que se pueda sintetizar glutamato y glutamina y en esta forma distribuir el nitrógeno para la síntesis de diferentes compuestos nitrogenados. Sin embargo, en el caso de que la glutamina sea utilizada como fuente de nitrógeno, la estrategia celular podría ser diferente, ya que este compuesto al donar su nitrógeno por transmidación libera siempre glutamato. El grupo del Dr. Jaime Mora propuso que en N. crassa, la glutamina como fuente de nitrógeno también es degradada hasta amonio para ser después resintetizada (41). Se propuso que la degradación de la glutamina ocurre por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa y la reasimilación del amonio de la glutamina ocurre por la GDH-NADPH y la GS, lo que da

origen a la operación de un ciclo aparentemente fútil (41).

Se ha estudiado la asimilación de la glutamina en Neurospora crassa y se ha encontrado que este aminoácido es degradado a amonio y 2-oxoglutarato a través de las enzimas de la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa (42). En esta vía la glutamina transamina para dar diferentes aminoácidos y 2-oxoglutarato a través de la participación de la transaminasa de glutamina, después, el 2-oxoglutarato formado es hidrolizado por la ω -amidasa a 2-oxoglutarato y amonio (42).

En N. crassa no se detecta actividad de glutaminasa, y experimentos con diversas mutantes e inhibidores demuestran que esta vía no opera en la degradación de la glutamina (42,43).

En cuanto a la participación de L-aminoácido oxidasa en la degradación de la glutamina en N. crassa, se ha reportado que la glutamina reprime a esta enzima (40). Se encontró que la actividad de L-aminoácido oxidasa en glutamina como fuente de nitrógeno es muy baja comparada con la actividad que se encuentra en histidina. Debido a que el DON inhibe completamente la excreción de amonio a partir de glutamina y a que la L-aminoácido oxidasa no es inhibida in vitro por este compuesto, parece ser que esta enzima tiene un papel menor en la degradación de glutamina (42).

La GOGAT juega un papel importante en la asimilación de la glutamina en N. crassa como lo indica la acumulación de la glutamina y la disminución en el contenido de glutamato y alanina en una mutante que carece de la actividad de esta enzima (43). Estos efectos son más aparentes en la doble mutante GOGAT⁻ ;GDH⁻

que acumula una gran cantidad de glutamina y tiene una poza de glutamato y alanina muy pequeña (43). La mayor excreción de amonio de la cepa GOGAT⁻;GDH⁻ comparada con la cepa GDH⁻ puede explicarse por la limitación de glutamato que impide la asimilación de éste por la GS (43). El alto contenido de glutamina en la cepa GOGAT⁻;GDH⁻ posiblemente se debe a que la limitación de glutamato impide la distribución de la glutamina, ya que ambos aminoácidos se requieren en algunas vías biosintéticas (43). El bajo crecimiento que presenta una cepa GOGAT⁻;GDH⁻ en glutamina como fuente de nitrógeno, así como su crecimiento óptimo en aminoácidos que eficientemente dan glutamato por transamidación, indican que la contribución de otras transamidadas a la poza de glutámico debe ser pequeña (43). Los resultados obtenidos indican que las enzimas que participan en la síntesis de glutamato en glutamina como fuente de nitrógeno son principalmente la GOGAT y la GDH (43). Esta última enzima asimila el nitrógeno que proviene de la degradación de la glutamina por la vía de transaminasa de glutamina- ω -amidasa.

El amonio liberado a partir de la glutamina es asimilado por la GDH, así como también por la GS como lo indica: a) la mayor excreción de amonio de la cepa GDH⁻;GS⁺ en comparación con la cepa GDH⁻ (43), b) la acumulación de glutamato y alanina que se da en la mutante GS⁺ (43), c) el marcaje de la glutamina en la cepa silvestre en presencia de [U-¹⁴C] sacarosa y la disminución del marcaje de la glutamina en una cepa GS⁺ (43). La excreción de hasta un 50% del nitrógeno de la glutamina como amonio en la cepa GOGAT⁻;GDH⁻ indica que una gran parte de la glutamina es

degradada a amonio, y que éste es asimilado nuevamente en glutámico y glutamina por la GDH y GS (43).

Se ha demostrado que para asimilar glutamina como fuente de nitrógeno es necesario convertir este aminoácido a glutámico, y que la GOGAT y la vía de la transaminasa de glutamina junto con la GDH son las enzimas que participan en esa conversión (43).

La síntesis de glutamina en presencia de este aminoácido como fuente de nitrógeno es necesaria como lo indica la correlación encontrada entre el crecimiento y la actividad de la GS en la mutante GS^+ en limitación de glutamina (43).

La glutamina también se degrada por la vía de la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa en amonio como fuente de nitrógeno como lo sugiere: a) la presencia de la actividad de la transaminasa de glutamina y de la ω -amidasa, b) la acumulación de 2-oxoglutamato en presencia de DON, c) el hecho de que en una mutante sin actividad de asparagino sintetasa pueda sustituirse su requerimiento por asparagina, con su correspondiente α -cetoácido (α -cetosuccinamato), debido a la aminación de éste por la transaminasa de glutamina. Estos datos indican que el reciclaje de glutamina también opera en esta condición (43).

El reciclaje de glutamina en Neurospora crassa puede servir para varias funciones además de la de contribuir a la irreversibilidad de la transaminasa de glutamina debido a la síntesis endergónica de glutamina, que en la reacción total envuelve un gran cambio de energía libre que favorece la formación de aminoácidos por esta transaminasa (33). Debido a que la glutamina, además de ser un donador de nitrógeno, es también un corre-

presor de catabolismo nitrogenado (44), su recambio puede ser una manera de regular rápidamente su concentración intracelular (45). Esto es debido a que un aumento en la velocidad de síntesis de la glutamina, combinado con una disminución en la velocidad de degradación de ésta, ocasionaría una rápida acumulación de la glutamina, y viceversa, una disminución en la velocidad de síntesis de la glutamina acompañada de un aumento en la degradación de ésta, ocasionaría una rápida disminución en la glutamina intracelular. De esta manera, se regularía rápidamente la concentración de la glutamina en la célula y ésta a su vez, regularía las actividades de la síntesis y la degradación del nitrógeno celular. El reciclaje de la glutamina puede ser también un mecanismo general para tomar o liberar el carbono de los compuestos orgánicos nitrogenados. El reciclaje de la glutamina a glutamato y otros aminoácidos puede ser una manera de mantener el balance de los compuestos nitrogenados (33).

En Neurospora crassa, el grupo del Dr. Mora ha demostrado que cuando se inhibe el reciclaje de la glutamina a través de inhibir su síntesis, se disminuye el catabolismo de carbono a partir de sacarosa (46). Estos resultados pueden explicar la necesidad de la operación del ciclaje de la glutamina (43,46). Se propuso que el punto de interacción en la regulación coordinada entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, puede ser el gasto de ATP para la síntesis de la glutamina. La regulación del metabolismo del carbono por la carga energética ha sido ampliamente estudiada (45). Así, cuando se crece Neurospora crassa en amonio y se inhibe la GS con glicina o L-metionina sulfoximina, la

concentración intracelular de ATP se incrementa comparada con la condición en la cual no se inhibe la GS (1).

En este trabajo se reportan los estudios de marcaje con L-[amido-¹³N] glutamina para conocer las vías que participan en la asimilación de la glutamina en Neurospora crassa en nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, la identificación de las vías que participan en la asimilación de la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y un estudio sobre el gasto energético del ciclaje de la glutamina en Neurospora crassa.

Objetivo

En estudios sobre el metabolismo nitrogenado en Neurospora crassa, en condiciones en las cuales se restringe el crecimiento de este hongo (47), o bien en ausencia de crecimiento, como sucede en conidias de cepas auxótrofas privadas del aminoácido que requieren (41,48), se encontró que existe una acumulación de algunos aminoácidos como arginina y glutamina. La acumulación de estos aminoácidos es paralela a un aumento en la actividad específica de la GS que, por lo menos en un caso, involucra la síntesis de novo de la enzima (41). A través del estudio de mutantes alteradas en las enzimas que participan en la asimilación de amonio, se dedujo que para que la acumulación de arginina se lleve a cabo se requiere resintetizar la glutamina (41). Para explicar esto, se propuso que la glutamina que entra a la célula es degradada a nitrógeno inorgánico y esqueletos de carbono, los cuales son reasimilados en glutamato y glutamina que se requieren para la síntesis de arginina y otros aminoácidos (41). Se propuso que la degradación y la resíntesis de la glutamina dan origen a la operación de un ciclo, el primer paso de este ciclo consiste en la síntesis de diferentes aminoácidos por medio de una transaminación de glutamina, el segundo paso es la hidrólisis del 2-oxoglutamato formado a 2-oxoglutarato y amonio por una ω -amidasa, el tercer paso es la utilización de estos productos por la deshidrogenasa glutámica biosintética para formar glutamato y el cuarto paso está dado por la resíntesis de glutamina a través de la glutamino sintetasa.

Se han demostrado las vías que participan en la asimilación de la glutamina cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno (42,43). Así, se ha demostrado que la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa participa en la degradación de la glutamina a amonio y 2-oxoglutarato (42). También la GOGAT participa en la asimilación de la glutamina sintetizando dos moléculas de glutamato (43). A partir de los resultados obtenidos utilizando inhibidores y mutantes en las enzimas que participan en la asimilación de amonio, se concluyó que el amonio liberado por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa es asimilado por la deshidrogenasa glutámica y la glutamino sintetasa, lo que da lugar a un ciclo en el cual la glutamina es continuamente degradada y resintetizada (43).

Uno de los objetivos de este trabajo es el demostrar las vías que participan en la asimilación de la glutamina y si opera el reciclaje de este aminoácido cuando se crece N. crassa en una fuente inorgánica de nitrógeno como NH_4NO_3 , condición en la cual uno podría esperar que no es necesario degradar la glutamina.

N. crassa no es capaz de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono (19), una posible causa podría ser que en esta condición operara el reciclaje de la glutamina y que el poder reductor (NADPH), energía (ATP) y esqueletos de carbono se utilizaran para la síntesis de glutamato y glutamina en lugar de ser utilizado para otras reacciones biosintéticas y crecer. De tal manera que otro objetivo de este trabajo es el demostrar en N. crassa las vías que participan en la asimilación de la glutamina, si opera el reciclaje de este aminoácido y conocer el gasto

energético del reciclaje de glutamina cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno y carbono.

Resultados

Los resultados sobre la operación del reciclaje de la glutamina en Neurospora crassa en nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, utilizando L-[amide- ^{13}N]glutamina como marca, se publicaron en el Journal of Bacteriology, 171:1772-1774, 1989. El título de este trabajo es " ^{13}N Isotope Studies of Glutamine Assimilation Pathways in Neurospora crassa", y los autores son: Calderón, J., A.J.L. Cooper, A.S. Gelbard y J. Mora.

Los resultados sobre el estudio sobre las vías que participan en la degradación de la glutamina en Neurospora crassa en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno y el gasto energético del reciclaje de la glutamina se publicarán en el Journal of General Microbiology, 135, 1989. El título de este trabajo es "Glutamine Assimilation Pathways in Neurospora crassa Growing on Glutamine as Sole Nitrogen and Carbon Source" y los autores son: Calderón, J. y J, Mora.

¹³N Isotope Studies of Glutamine Assimilation Pathways in *Neurospora crassa*

JORGE CALDERÓN,¹ ARTHUR J. L. COOPER,² ALAN S. GELBARD,³ AND JAIME MORA^{1*}

Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México,¹ and Department of Biochemistry and Neurology, Cornell University Medical College,² and Biophysics Laboratory, Memorial Sloan Kettering Cancer Center,³ New York, New York 10021

Received 1 August 1988/Accepted 16 December 1988

L-[amide-¹³N]glutamine in *Neurospora crassa* is metabolized to [¹³N]glutamate by glutamate synthase and to [¹³N]ammonium by the glutamine transaminase- ω -amidase pathway. The [¹³N]ammonium released is assimilated by glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase, confirming the operation of a glutamine cycle. Most of the nitrogen is retained during cycling between glutamate and glutamine.

In *Neurospora crassa*, glutamine, in addition to participating in transamidation reactions, is converted to 2-oxoglutarate and ammonium by the enzymes of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway, in which a transaminase catalyzes transfer of amino nitrogen of glutamine to various oxo acids. 2-Oxoglutarate thus produced is hydrolyzed by ω -amidase to 2-oxoglutarate and ammonium ion (2).

The amine nitrogen of glutamine is also assimilated by the action of glutamate synthase (glutamine oxoglutarate amidotransferase [GOGAT]), which synthesizes two molecules of glutamate from glutamine and 2-oxoglutarate (1). From the results obtained with several inhibitors and mutants, Calderón and Mora concluded that the ammonium ion released by the ω -amidase pathway is assimilated by glutamate dehydrogenase (GDH) and by glutamine synthetase (1, 2). These enzymes, when combined with the glutamine transaminase and ω -amidase, yield a glutamine cycle in which glutamine is continually degraded and resynthesized (1). We report here the data obtained by using L-[amide-¹³N]glutamine as a tracer to study the metabolic pathways of glutamine assimilation in *N. crassa*.

¹³N, the longest-lived radioisotope of nitrogen ($t_{1/2} = 9.96$ min), was used to label ammonia (7). L-[amide-¹³N]glutamine was prepared from [¹³N]ammonia by using glutamine synthetase immobilized onto CNBr-activated Sepharose as previously described (16).

The *N. crassa* cultures were grown for 8 h at 30°C on Vogel minimal medium (17) containing 1.5% sucrose and 25 mM NH₄NO₃ as the nitrogen source. Six milliliters of this medium was centrifuged, and after decantation, 50 μ l of L-[amide-¹³N]glutamine (1 to 5 mCi [50 to 100 μ M]) was added to the cell suspension. Uptake of label was stopped by adding 2 ml of water, and after centrifugation and a further wash, the metabolites were extracted with 0.2 ml of ice-cold 1% (wt/vol) picric acid. The ¹³N-labeled metabolites were analyzed by using a high-pressure liquid chromatography system (Series 4; The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn.) in which the effluent was continuously monitored with a Ramona D flowthrough γ detector (5).

A Partisil 10 SCX 10 μ M (4.6 by 250 mm) (Phenomenex, Rancho Palo Verdes, Calif.) analytical cation-exchange column was used for separation; the elution conditions were as reported previously (5). In some cases glutamate was mea-

sured by high-pressure liquid chromatography of the α -phthalaldehyde derivatives (10), and ammonia content was determined enzymatically with glutamate dehydrogenase (4).

The relative radioactivity incorporated into the α -amino and amide groups of glutamine was determined as follows. A sample (0.1 ml) of the picric acid supernatant was added to a Dowex-1 column (acetate form; 0.5 by 2 cm), overlaid with Dowex-50 resin (Tris form; 0.5 by 2 cm), and washed with 2 ml of water. The eluate (from which ammonium and glutamate were removed) was adjusted to pH 5 with 2 M acetic acid, and 5 U of glutaminase (grade V; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) was added. The solution was incubated at 30°C for 10 min and poured onto a Dowex-50 column (Tris form; 0.5 by 4 cm). The pass-through from this column and a 2-ml water wash were added to a Dowex-1 column (acetate form; 0.5 by 4 cm), which in turn was eluted with 5 ml of water. The radioactivity retained on the columns was measured by placing them in an Auto gamma counter (LKB Instruments, Rockville, Md.). Label retained on the second Dowex-1 column and on the Dowex-50 column represented label originally present in the amino group and the amide group of glutamine, respectively.

2-Oxo-[¹³N]glutaramate was prepared from L-[amide-¹³N]glutamine (cf. 3), and label in this compound was determined as follows. A 0.1-ml sample of the picric acid supernatant was added to a Dowex-1 column (acetate form; 0.5 by 4 cm) and washed with water. The pass-through and water washes were saved. 2-Oxo-[¹³N]glutaramate was eluted with 0.4 ml of 2 M acetic acid followed by 1 ml of water. To the combined eluate (1.4 ml) was added 2 ml of 1 M Tris hydrochloride (pH 8.5) and 80 U of purified rat liver ω -amidase (3). This solution was incubated at 30°C for 20 min and then added to a Dowex 50 column (Tris form; 0.5 by 4 cm) and washed with 2 ml of water. This pass-through was combined with the Dowex-1 pass-through, and the label in these combined fractions plus the label remaining on the Dowex-1 column represented label incorporated into metabolites other than 2-oxoglutarate; the label retained on the Dowex-50 column represented label originally present in 2-oxoglutarate.

After the addition of L-[amide-¹³N]glutamine to the wild-type strain, glutamate was more highly labeled than other nitrogen-containing metabolites, with the exception of glutamine (Table 1). At 25 min, a small but significant amount of

* Corresponding author.

TABLE 1a Distribution of label derived from L-[amide-¹³N]glutamine among various metabolites

Metabolite	Percentage of label in:			
	Wild-type strain		GDH ⁻ mutant strain (10-min label)	Wild-type strain plus MS ^a (25-min label)
	5-min label	25-min label		
Acid compounds ^b	1.36	2.60	1.34	
Carbamyl phosphate	0.18	1.21	0.19	
Aspartate	0.16	0.26	0.43	
Glutamate	8.34	13.9	16.1	22.7
Glutamine ^c	86.0	78.4	43.4	40.2
Proline ^d	0.37	0.24	0.81	
Ammonium	2.98	0.78	14.4	
Histidine ^d	0.07	0.19	ND ^e	
Arginine	ND	1.21	ND	
Alanine	ND	ND	21.9	14.7
2-Oxoglutarate	ND	0.07		
Glutamine (amine)	1.73	8.00	5.60	1.7

^a Incubated previously for 20 min with methionine sulfoximine (MS).

^b Compounds of undetermined structure eluting earliest from the SCX column.

^c ¹³N label in amine plus amide.

^d Tentative assignment.

^e ND, Not detected.

label was present in 2-oxoglutarate (Table 1). The fact that the labeling of the amino group of glutamine increased during the first 25 min after the pulse (Table 1) provides direct evidence that the amide nitrogen of glutamine was redistributed in the glutamine molecule through the formation of glutamate by GOGAT or from the glutamine transaminase- ω -amidase pathway, followed by reductive amination by GDH (1).

In a mutant strain lacking GDH activity (GDH⁻) (6), the relative amount of label in ammonium was higher (Table 1) than that found in the wild-type strain (Table 1). In this mutant, the intracellular ammonium pool was larger (1.4 μ mol/mg of protein), and the intracellular glutamate pool was smaller (65 nmol/mg of protein) than those of the wild-type strain (0.4 μ mol/mg of protein and 135 nmol/mg of protein, respectively). These data indicate that an important fraction of the ammonium derived from glutamine degradation is normally assimilated by GDH into glutamate (12). No glutaminase activity has been detected in *N. crassa* (9) and the double mutant strain (GDH⁻ GOGAT⁻) requires glutamate for growth (1). Thus, as Table 1 indicates, GOGAT is responsible for [¹³N]glutamate formation from L-[amide-¹³N] glutamine in the GDH⁻ strain.

The presence of a glutaminase would produce [¹³N]glutamate from L-[amide-¹³N]glutamine only after glutamine had been labeled in the amino group. Table 1 shows that the label in glutamate is threefold higher than that present in the amine of glutamine.

The GDH⁻ mutant strain has a higher GOGAT activity than does the wild-type strain (12). Furthermore, 2-oxoglutarate is accumulated in this mutant strain (11, 12). The relatively large incorporation of label into glutamate in the GDH⁻ mutant strain (Table 1) can be explained as a result of high GOGAT activity and the accumulation of 2-oxoglutarate.

In contrast, the amount of label incorporated into glutamate in the wild-type strain is lower than that in the GDH⁻ strain because glutamate is synthesized to a large extent by GDH; as a consequence, the glutamate concentration is lower in this mutant (as shown above and in reference 12). The important role of GDH and GOGAT was further shown in experiments carried out with GOGAT⁻ mutants. After 20

min of incubation with L-[amide-¹³N]glutamine, 83% of the label was recovered in glutamine (of which ~90% was in the amide and ~10% was in the amine position) and 3% was in glutamate. Thus, 11% of the label in this experiment with GOGAT⁻ mutants was in glutamine (amine) plus glutamate, compared with 22% (Table 1) in the wild-type.

The difference in the labeling of the amine and the amide groups of glutamine (Table 1) in the wild-type strain compared with that in the GDH⁻ strain (Table 1) can be understood in part if the NH₄⁺ accumulated (as shown above and in reference 12) lowers the relative specific activity of [¹³N]ammonium and also if the relative specific activity of [¹³N]glutamate is higher in the GDH⁻ mutant.

The appreciable transfer of amine (glutamate plus glutamine) nitrogen to alanine in the GDH⁻ strain (Table 1) but not in the wild-type strain may be explained by accumulation of pyruvate as a result of a decrease in 2-oxoglutarate utilization in this strain (11, 14).

In the wild-type strain, nitrogen derived from glutamine (amide) was not diverted to other compounds as extensively as in the GDH⁻ mutant strain (Table 1), but rather was efficiently incorporated into glutamine (amine) via glutamate (Table 1).

As expected, inhibition of glutamine synthetase activity by L-methionine sulfoximine (15) greatly decreased the label in glutamine (amine and total). As a result of glutamine synthetase inhibition, labeled glutamate accumulated (Table 1) and some label was transferred to alanine.

The retention of more than 90% of the ¹³N label in glutamate and glutamine in the wild-type strain (Table 1) indicates that almost all the nitrogen was retained during cycling between these two metabolites. This could explain why the energy spent in glutamine cycling is very high (13; J. Calderon and J. Mora, submitted for publication) and why the synthesis of glutamine is necessary for the effective utilization of carbon (8).

We are grateful to Georgina Hernández, Lorenzo Segovia, and Yolanda Mora for critically reviewing the manuscript; to Sabina File-DeRico and Janet Finegan for technical assistance; and to the Memorial Sloan-Kettering Cancer Facility for the production of ¹³N. We thank Alton Meister for making possible the realization of this work.

This work was supported in part by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zebada (to J.C. and J.M.), by Public Health Service grants DK 16379 (to A.J.L.C.) and CA6403 (to A.S.G.) from the National Institutes of Health, and by U.S. Department of Energy contract DE-FG02-86ER60407 (to A.S.G.). We also acknowledge the support of the U.S. National Academy of Sciences in organizing and providing funds for the collaboration between the two laboratories.

LITERATURE CITED

1. Calderón, J., and J. Mora. 1985. Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:3237-3242.
2. Calderón, J., E. Morett, and J. Mora. 1985. ω -Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **161**:807-809.
3. Cooper, A. J. L., T. E. Duffy, and A. Meister. 1985. α -Keto-acid ω -amidase from rat liver. *Methods Enzymol.* **113**:45-46.
4. Cooper, A. J. L., J. M. McDonald, A. S. Gelbard, R. F. Gledhill, and T. E. Duffy. 1979. The metabolic fate of nitrogen-13 labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* **254**:4982-4992.
5. Cooper, A. J. L., E. Nieves, A. E. Coleman, S. Filic-DeRicco, and A. S. Gelbard. 1987. Short-term metabolic fate of [^{13}N]ammonia in rat liver *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **262**:1073-1080.
6. Fincham, J. R. S. 1950. Mutant strains of *Neurospora* deficient in aminating ability. *J. Biol. Chem.* **182**:61-73.
7. Gelbard, A. S., L. P. Clarke, J. M. McDonald, W. G. Monahan, R. S. Tilbury, T. Y. T. Kuo, and J. S. Laughlin. 1975. Enzymatic synthesis and organ distribution studies with ^{13}N -labeled L-glutamine and L-glutamic acid. *Radiology* **116**:127-132.
8. Hernández, G., and J. Mora. 1986. Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:3315-3325.
9. Imada, A., S. Igarasi, K. Nakahama, and M. Isono. 1973. Asparaginase and glutaminase activities in microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **76**:85-99.
10. Jones, B. N., S. Pääbo, and S. Stein. 1981. Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved *o*-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure. *J. Liquid Chromatogr.* **4**:565-586.
11. Limón-Lason, J., M. Lara, B. Resendiz, and J. Mora. 1977. Regulation of glutamine synthetase in fed-batch cultures of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**:1234-1240.
12. Lomnitz, A., J. Calderón, G. Hernández, and J. Mora. 1987. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2333-2340.
13. Mora, J., J. Calderón, and G. Hernández. 1988. Search, assimilation and turnover of nitrogen in some fungi, p. 59-81. In S. Sánchez-Esquivel (ed.), *Nitrogen source control of microbial processes*. CRC Press, St. Paul, Minn.
14. Mora, Y., G. Hernández, and J. Mora. 1987. Regulation of carbon and nitrogen flow by glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1667-1674.
15. Ronzio, R. A., and A. Meister. 1968. Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**:164-170.
16. Rosenspire, K. C., A. S. Gelbard, A. J. L. Cooper, F. A. Schmid, and J. Roberts. 1985. [^{13}N]Ammonia and *l*-[amide- ^{13}N]glutamine metabolism in glutaminase-sensitive and glutaminase-resistant murine tumors. *Biochim. Biophys. Acta* **843**:37-48.
17. Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13**:42-43.

Glutamine Assimilation Pathways in *Neurospora crassa* Growing on Glutamine as Sole Nitrogen and Carbon Source

By JORGE CALDERÓN AND JAIME MORA*

Departamento de Ecología Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

(Received 17 March 1989; revised 19 June 1989; accepted 26 June 1989)

Neurospora crassa wild-type is almost unable to grow on glutamine as sole nitrogen and carbon source but a GDH⁻;GS[±] double mutant strain, lacking NADP-dependent glutamate dehydrogenase and partially lacking glutamine synthetase did grow. Under these conditions, the double mutant had a higher chemical energy content than the wild-type. Enzyme assays and labelling experiments with glutamine indicated that in the double mutant glutamine was degraded to ammonium and to carbon skeletons by glutamate synthase, the catabolic (NADH-dependent) glutamate dehydrogenase and the glutamine transaminase- ω -amidase pathway.

INTRODUCTION

Since glutamine is a nitrogen donor and the final product of ammonium assimilation in microorganisms, it plays a central metabolic role as a repressor of nitrogen catabolism. It has been shown that in *Neurospora crassa* glutamine is a negative regulator of nitrogen catabolism (Vaca & Mora, 1977; Marzluf, 1981). Glutamine synthetase (GS) (EC 6.3.1.2) is composed of two polypeptides (Sánchez *et al.*, 1980; Dávila *et al.*, 1980) and glutamine regulates the level of specific enzyme synthesis (Vichido *et al.*, 1978), which correlates with the amount of mRNA (Sánchez *et al.*, 1978; Lara *et al.*, 1982). The carbon source also participates by regulating GS degradation (Mora *et al.*, 1980).

In *N. crassa*, glutamine, in addition to being assimilated by transamination reactions, is converted into 2-oxoglutarate and ammonium by the enzymes of the glutamine transaminase- ω -amidase pathway (Calderón *et al.*, 1985). In this pathway, glutamine is transaminated to yield different amino acids and 2-oxoglutaramate through the participation of a glutamine transaminase (T-Gln). Subsequently, the 2-oxoglutaramate is hydrolysed to 2-oxoglutarate and ammonium by the action of an ω -amidase (Calderón *et al.*, 1985). In this fungus, glutamine is also assimilated directly to α -amino nitrogen by the action of glutamate synthase (GOGAT) (EC 1.4.1.14), which synthesizes two molecules of glutamate (Calderón & Mora, 1985). The ammonium released by the glutamine transaminase- ω -amidase pathway is assimilated by NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) (EC 1.19.4.1.4) and also by GS, thus leading to the operation of a glutamine cycle (Calderón & Mora, 1985). GOGAT also participates in cycling glutamine to glutamate (Calderón & Mora, 1985). As a result of the glutamine cycle, glutamate and glutamine are continually resynthesized (Calderón & Mora, 1985) at the expense of carbon skeletons, reductive power and ATP. No glutaminase activity has been detected in *N. crassa* (Calderón *et al.*, 1985). We have reported (Hernández & Mora, 1986) that cycling is necessary to maintain an optimal carbon flow from sucrose.

Abbreviations: AOA, aminooxyacetic acid; DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine; GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; T-Gln, glutamine transaminase.

It has been shown (Calderón & Mora, 1985) that for glutamine to be optimally assimilated as a nitrogen source, it must be converted to glutamate, the other nitrogen donor. The activity of GOGAT and the incorporation of the ammonium released by the glutamine transaminase- ω -amidase pathway through the NADP-GDH are essential to synthesize glutamate, since the contribution of amidotransferases other than GOGAT is a minor component of the net assimilation of glutamine into glutamate (Calderón & Mora, 1985).

Glutamine cycling operates in the presence of ammonium as nitrogen source as indicated by the presence of 2-oxoglutarate under such conditions (Calderón *et al.*, 1985). Studies using ^{15}N as a tracer have also shown the operation of glutamine cycling in *N. crassa*, where most of the nitrogen is retained cycling between glutamate and glutamine (Calderón *et al.*, 1989).

N. crassa is almost unable to grow on glutamine as sole nitrogen and carbon source (Mora *et al.*, 1980). We propose that this may be explained by the great expenditure of energy as a result of glutamine cycling (Calderón & Mora, 1985), and also as a result of the trapping of carbon skeletons in the continuous synthesis of glutamate and glutamine. In this paper we report that in conditions where glutamate and glutamine synthesis are restricted, *N. crassa* can spare carbon skeletons and chemical energy, which in turn allows this fungus to grow on glutamine as the sole nitrogen and carbon source. In addition, the pathways for glutamine assimilation for use as a nitrogen and a carbon source have been identified.

METHODS

Strains. All stocks came from the collection of J. Mora or from the Fungal Genetics Stock Center, Humboldt State University, Arcata, California, USA. The basic stocks were the wild-type strain 74-A; the *am-1* strain lacking glutamate dehydrogenase (GDH⁻) (Fincham, 1950); the *gln1a* strain partially lacking glutamine synthetase activity (GS[±]) (Dávila *et al.*, 1978); the double mutant strain *am-1;gln1a* (GDH⁻;GS[±]); and the *en-am-2* strain (GOGAT⁻) that lacks GOGAT activity (Hummelt & Mora, 1980b).

Growth conditions. Cultures of *N. crassa* were grown on Vogel's minimal medium (Vogel, 1964) supplemented with 5 mM-glutamine, instead of ammonium nitrate, as the nitrogen source, at 30 °C with shaking as indicated. The carbon source used is stated in the text.

Growth was measured as described previously (Vichido *et al.*, 1978) by determining the total protein concentration by the Lowry method.

Determination of amino acid pools. Samples for amino acid analysis were prepared by homogenizing conidia with 80% (v/v) ethanol (Espín *et al.*, 1979). The amino acids were separated in an Aminco Amino Acid Analyzer, coupled with *ortho*-phthalaldehyde (Sigma) and quantified in an Aminco ratio fluorimeter.

Ammonium determination. Ammonium concentration in samples of medium was measured with an Orion electrode (Espín *et al.*, 1979).

Determination of nucleotides. After 8 h growth, 300 ml of the culture medium were quickly filtered and immersed in liquid nitrogen, and the nucleotides were extracted by resuspending the samples in 0.6 M-HClO₄. The extracts were centrifuged at 10000 r.p.m. for 2 min, and the supernatants were adjusted to pH 7-7.5 by adding 1.0 M-KOH with rapid mixing. The insoluble KClO₄ was removed by centrifugation. The nucleotides were separated and quantified by high-performance liquid chromatography on a Radial Pak sax-cartridge (Waters). The chromatographic conditions were essentially the same as those used by McKeag & Brown (1978).

Determination of enzyme activities. Cell-free extracts of *N. crassa* were prepared as described previously (Dávila *et al.*, 1978). GS activity was measured by its synthetase activity as described by Ferguson & Sims (1974). Catabolic NAD-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH) and NADP-GDH were measured as described by Fincham (1950). GOGAT was measured as described by Hummelt & Mora (1980a). T-Gln was measured as described by Calderón *et al.* (1985).

Measurement of CO₂ from [U-¹⁴C]glutamine. Samples of cultures grown for 12 h on 5 mM-glutamine as sole nitrogen and carbon source were transferred to a side-arm tube with fresh medium without glutamine, and preincubated for 15 min with or without the inhibitors aminooxyacetic acid (AOA; 10 mM) and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON; 1 mM). These cultures were then given a 1 h pulse with [U-¹⁴C]glutamine [0.2 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ (7.5 kBq ml^{-1})] and unlabelled glutamine to give a final concentration of 0.5 mM. The CO₂ released was absorbed with NaOH (Mora *et al.*, 1972). When the CO₂ released was measured continually during 12 h of growth, the cultures were grown on 5 mM-glutamine with [U-¹⁴C]glutamine [0.2 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ (7.5 kBq ml^{-1})] with shaking at 250 r.p.m. (OD₅₄₀ of inoculum 0.1).

Glutamine labelling with [U-¹⁴C]glutamate. Conidia from the wild-type, GS[±] and GDH⁻;GS[±] strains were germinated for 12 h in a medium supplemented with 5 mM-glutamine. The mycelium was collected by filtration

Glutamine assimilation by *Neurospora crassa*

and transferred to a medium containing 5 mM-glutamine and $0.5 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ($18.75 \text{ kBq ml}^{-1}$) [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glutamate. After 90 min incubation the mycelium was collected and the amino acid content was determined as reported by Espin *et al.* (1979); the radioactivity incorporated in each amino acid was determined in a scintillation counter.

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

RESULTS

Growth of the wild-type strain and the double mutant strain GDH⁻;GS[±] on glutamine as a nitrogen and carbon source

The *N. crassa* wild-type strain (74-A) grew very slowly on glutamine as a nitrogen and carbon source (Fig. 1*a*). Previously, we described a glutamine cycle in which glutamine is continually degraded and resynthesized in *N. crassa* (Calderón & Mora, 1985; Calderón *et al.*, 1989). This cycle consumes NADPH and ATP for glutamate and glutamine synthesis, respectively. On this basis, we tested the capacity of the double mutant strain, lacking NADP-GDH activity and partially lacking GS activity (GDH⁻;GS[±]), to grow on glutamine as the sole nitrogen and carbon source. The double mutant strain did grow but the growth rate was slower than that on glutamine plus sucrose (Fig. 1*a*). The growth rate of the double mutant strain increased when the culture was optimally aerated by lowering the inoculum size (Fig. 1*b*). Even the wild-type strain could grow on glutamine as nitrogen and carbon source if the culture was inoculated at low cell density (Fig. 1*b*). The aeration was also modified by shaking at a low speed. When the wild-type and the double mutant strains were incubated with shaking at 100 r.p.m., their growth rates were lower even with a low inoculum (Fig. 1*c*). Under these conditions the double mutant strain showed a similar growth rate on glutamine as nitrogen and carbon source as on glutamine plus sucrose; however, the wild-type grew only on glutamine plus sucrose (Fig. 1*c*).

Chemical energy content, glutamine cycling enzymes, amino acid content and ammonium excretion

The NADH, NADPH, ATP and ADP contents were higher in the GDH⁻;GS[±] double mutant strain compared to the wild-type strain, when these strains were incubated on glutamine as nitrogen and carbon source (Fig. 2). The difference in total chemical energy was almost 200% when comparing the double mutant strain with the wild-type strain (Fig. 2). The activities of the enzymes involved in glutamine cycling were measured. NAD-GDH activity was also determined since the conversion of glutamine to glutamate would supply this amino acid which can then be catabolized by NAD-GDH for the production of 2-oxoglutarate. As reported previously (Dantzig *et al.*, 1978), NAD-GDH and NADP-GDH are regulated by the carbon source. Table 1 shows that on glutamine as nitrogen and carbon source the wild-type strain had a low biosynthetic NADP-GDH activity, although this was at least 14-fold higher than in the double mutant strain. However, under the same conditions the catabolic NAD-GDH activity of the double mutant was 62% greater than that in the wild-type. The GDH⁻;GS[±] double mutant strain catabolized glutamine efficiently, as indicated by the lower glutamine content (Table 2).

GOGAT also participates in glutamine assimilation. As shown in Table 1, GOGAT activity was 64% higher in the GDH⁻;GS[±] mutant strain on glutamine without sucrose compared to the wild-type strain. In such conditions GOGAT activity is expressed despite the presence of a glutamate pool (Table 2) which has been shown to repress GOGAT in *N. crassa* (Hummelt & Mora, 1980*b*; Lomnitz *et al.*, 1987). As already reported (Dávila *et al.*, 1978), the single mutant GS[±] strain has 10-fold less GS activity than the wild-type strain. This was also true for the GDH⁻;GS[±] double mutant strain growing in the presence of sucrose (Table 1). Similar to NADP-GDH, GS activity was lower in the wild-type strain on glutamine compared to glutamine plus sucrose. Nevertheless, GS activity in the wild-type strain was 250% of that in the GDH⁻;GS[±] mutant strain growing on glutamine as nitrogen and carbon source.

In the GDH⁻;GS[±] strain growing on glutamine alone as carbon and nitrogen source, 2-oxoglutarate could be supplied to the tricarboxylic acid cycle through the operation of GOGAT and the catabolic NAD-GDH activities (Table 1).

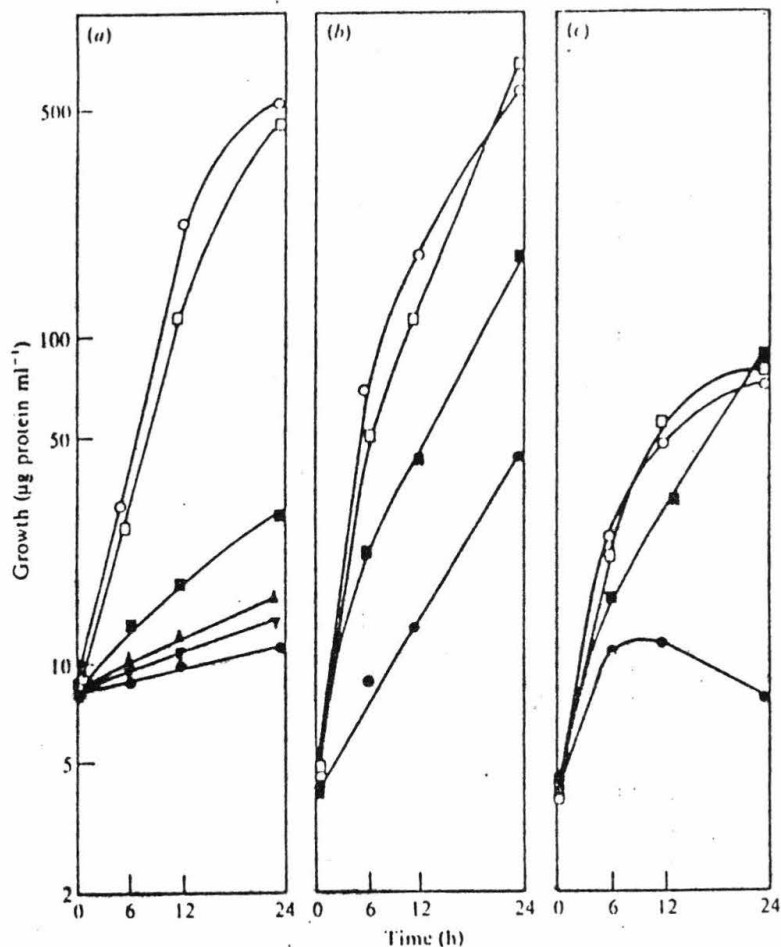


Fig. 1. Growth curves of the wild-type (O, ●), GDH⁻; GS⁺ (□, ■), GS⁺ (▲) and GDH⁻ (▼) strains from cultures grown on 5 mM-glutamine with (open symbols), or without (filled symbols) 1.5% (w/v) sucrose. The cultures were grown as follows: (a) shaking at 250 r.p.m., inoculum OD₅₄₀ = 0.1; (b) shaking at 250 r.p.m., inoculum OD₅₄₀ = 0.05; (c) shaking at 100 r.p.m., inoculum OD₅₄₀ = 0.05.

Table 1. Specific enzyme activities of the wild-type and GDH⁻; GS[±] strains

The specific enzyme activities were determined after 12 h growth on 5 mM-glutamine with or without 1.5% (w/v) sucrose as carbon source. The cultures were grown with shaking at 250 r.p.m.; the A₅₄₀ inoculum had an OD₅₄₀ of 0.1. ND, Not detected.

Strain	Sucrose	Specific activity [nmol min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]				
		GOGAT	T-Gln	NAD-GDII	NADP-GDII	GS
Wild-type	+	10.9	39	18.3	804.0	6.0
	-	8.1	3.4	2130.0	14.0	1.0
GDH ⁻ ; GS [±]	+	10.6	2.8	18.9	ND	0.6
	-	13.3	5.5	3440.0	ND	0.4

Glutamine assimilation by *Neurospora crassa*

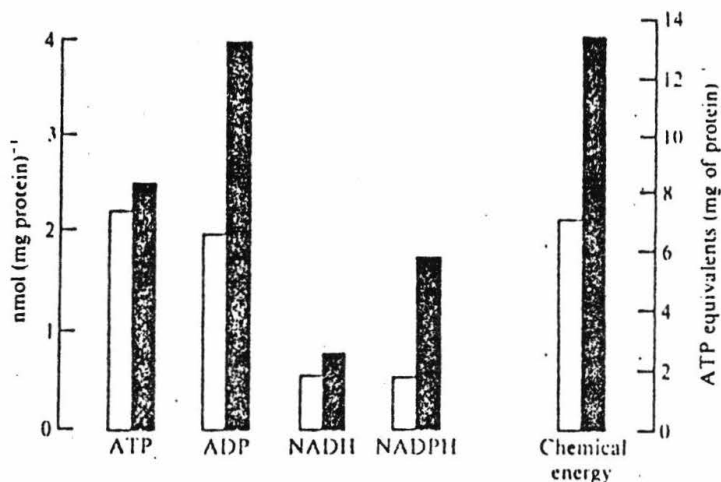


Fig. 2. Chemical energy content of the wild-type strain (□) and the GDH⁻;GS[±] double mutant strain (■) growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source. The nucleotides were determined after 8 h of incubation. Chemical energy is expressed as the sum of ATP equivalents (1, 1/2, 3 and 4 for ATP, ADP, NADH and NADPH respectively). The cultures were inoculated at an OD₅₄₀ of 0.1 and grown with shaking at 250 r.p.m.

Table 2. Glutamine and glutamate content of the wild-type, GS[±], and GDH⁻;GS[±] strains growing on 5 mM-glutamine as sole nitrogen and carbon source

Amino acid contents was determined after 12 h growth. The cultures were grown with shaking at 250 r.p.m.; the inoculum had an OD₅₄₀ of 0.1.

Strain	Amino acid	Amino acid content [μmol (mg protein) ⁻¹]
Wild-type	Glutamate	0.3
	Glutamine	1.5
GS [±]	Glutamate	0.5
	Glutamine	1.1
GDH ⁻ ;GS [±]	Glutamate	0.3
	Glutamine	0.4

Table 3. Ammonium excretion by the wild-type, GDH⁻, GS[±] and GDH⁻;GS[±] strains growing on 5 mM-glutamine as sole nitrogen and carbon source

Ammonium present in the culture medium was determined after 12 h growth. The cultures were grown with shaking at 250 r.p.m., the inoculum had an OD₅₄₀ of 0.1.

Strain	Ammonium excretion	
	(μmol ml ⁻¹)	[μmol (mg protein) ⁻¹]
Wild-type	0.15	8.29
GDH ⁻	0.29	13.18
GS [±]	0.42	18.50
GDH ⁻ ;GS [±]	1.92	22.85

With glutamine as nitrogen and carbon source both the wild-type strain and the GDH⁻;GS[±] mutant strains excreted ammonium as the result of glutamine degradation; however, the double mutant strain excreted almost three times more ammonium than the wild-type (Table 3).

We reported previously (Calderón *et al.*, 1985) that in *N. crassa* glutamine is degraded by the glutamine transaminase-*ω*-amidase pathway. Table 1 shows that T-Gln activity was present in the wild-type and the double mutant strain grown on glutamine in the presence or absence of

Table 4. Effect of inhibitors on $^{14}\text{CO}_2$ release from [^{14}C]glutamine by the wild-type and GOGAT $^-$ strains growing on glutamine as sole carbon and nitrogen source

Strain	Inhibitor	$^{14}\text{CO}_2$ release
		[c.p.m. (mg protein $^{-1}$) $^{-1}$]
Wild-type	None	55126
	DON (1 mM)	3626
	AOA (10 mM)	9831
GOGAT $^-$	None	21574
	DON (1 mM)	2079
	AOA (10 mM)	3753

Table 5. $^{14}\text{CO}_2$ release by the wild-type, GDH $^-$, GS $^\pm$ and GDH $^-$;GS $^\pm$ strains growing on 5 mM-glutamine as sole nitrogen and carbon source

$^{14}\text{CO}_2$ released was determined during 12 h growth on 5 mM-glutamine and 0.2 μCi ml (7.4 kBq) [^{14}C]glutamine. The cultures were grown with shaking at 250 r.p.m.; the inoculum had an OD_{540} of 0.1.

Strain	$^{14}\text{CO}_2$ release	
	c.p.m.	[c.p.m. (mg protein $^{-1}$) $^{-1}$]
Wild-type	325371	442681
GDH $^-$	330629	430506
GS $^\pm$	530834	592448
GDH $^-$;GS $^\pm$	1331067	313930

sucrose; activity was 62% higher in the GDH $^-$;GS $^\pm$ strain growing on glutamine as nitrogen and carbon source as compared to the wild-type strain (Table 1).

Although low NADP—GDH and GS activities were present in the wild-type strain growing on glutamine without sucrose (Table 1), some of the ammonium released from glutamine must be incorporated since the GDH $^-$ and GS $^\pm$ single mutant strains excreted 59% and 123%, respectively, more ammonium than the wild-type strain (Table 3) and did not grow as well as the GDH $^-$;GS $^\pm$ strain under such conditions (Fig. 1a).

Glutamine degradation and synthesis

The glutamine degradation pathways of *N. crassa* growing on glutamine as sole nitrogen and carbon source were demonstrated by incubating the wild-type and GOGAT $^-$ strains with [^{14}C]glutamine and measuring CO_2 production (Table 4). In the wild-type strain, DON, an inhibitor of amidotransferase and ω -amidase activities, lowered CO_2 production by 93%; when AOA, an inhibitor of aminotransferases was added, $^{14}\text{CO}_2$ release fell by 82% (Table 3). The amount of $^{14}\text{CO}_2$ released by the GOGAT $^-$ strain was only 31% of that released by the wild-type; DON inhibited by 90% and AOA inhibited by 83% the amount of $^{14}\text{CO}_2$ released by this strain (Table 4).

These results indicate that glutamine is degraded to 2-oxoglutarate by GOGAT, the catabolic NAD-GDH and the glutamine transaminase- ω -amidase pathway. Glutamine oxidation was also determined in the single mutants GDH $^-$ and GS $^\pm$, in the double mutant GDH $^-$;GS $^\pm$ and in the wild-type strain. The mutant strains oxidized more glutamine than the wild-type strain. The wild-type strain and the single mutant strains oxidized more glutamine per mg of protein than the double mutant strain. However, total CO_2 production was four times greater in the double mutant strain compared to the wild-type strain (Table 5).

Glutamine synthesis in the presence of glutamine as sole nitrogen and carbon source was demonstrated by incubating the wild-type and mutant strains with [^{14}C]glutamate. Glutamine labelling in the wild-type strain was five and thirteen times greater, respectively, than in the GS $^\pm$ and GDH $^-$;GS $^\pm$ strains, in spite of the higher specific radioactivity found in glutamate

Glutamine assimilation by *Neurospora crassa*

Table 6. Incorporation of label from [¹⁴C]glutamate into glutamine in the wild-type, GS[±] and GDH⁻;GS[±] strains growing on 5 mM-glutamine as sole nitrogen and carbon source

Strain	Glutamine labelling [c.p.m. (mg protein) ⁻¹]	Specific radioactivity found in glutamate [c.p.m. (μmol glutamate) ⁻¹]
Wild-type	37524	230000
GS [±]	6905	332742
GDH ⁻ ;GS [±]	2788	343685

(Table 6). This indicates that the ammonium that comes from glutamine degradation is sequentially converted to glutamine. The fourfold lower glutamine content in the GDH⁻;GS[±] strain in comparison with the wild-type strain (Table 2) indicates that glutamine cycling is severely impaired in the double mutant.

DISCUSSION

In *N. crassa* glutamine is degraded by the glutamine transaminase- ω -amidase pathway to ammonium and 2-oxoglutarate (Calderón *et al.*, 1985) and the ammonium released by this pathway is assimilated by NADP-GDH and by GS, thus leading to the operation of a glutamine cycle by which this amino acid is continually degraded and resynthesized (Calderón & Mora, 1985). Glutamine is also cycled by GOGAT to glutamate (Calderón & Mora, 1985).

Although glutamine is converted to 2-oxoglutarate, this amino acid cannot be efficiently utilized as a nitrogen and carbon source by wild-type *N. crassa* (Mora *et al.*, 1980), possibly because of the great expenditure of energy as a result of glutamine cycling (Calderón & Mora, 1985). There have been reports indicating that a great amount of energy is expended in glutamine synthesis. It has been shown that when ammonium is added to an ammonium limited culture of *E. coli*, there is a burst of glutamine synthesis which imposes a drastic drain on ATP; the accumulated glutamine activates the enzymes for GS inactivation by adenylation and thus the ATP pool is replenished (Wohlhueter *et al.*, 1973). Fisher *et al.* (1986) reported that in *Bacillus subtilis*, the presence of the herbicide glyphosate results in the largely futile utilization of significant amounts of phosphoenolpyruvate and ATP. The dramatic ability of L-glutamate and L-glutamine to increase glyphosate resistance in *B. subtilis* fits in with possible consequence of energy drain on nitrogen assimilation.

We used a double mutant lacking NADP-GDH and partially lacking GS in order to prevent the waste of energy and carbon skeleton drain in the synthesis of glutamate and glutamine. This GDH⁻;GS[±] double mutant strain grew on glutamine as sole carbon and nitrogen source while the wild-type grew only very slowly. The GDH⁻ and GS[±] single mutants also grew only slightly on glutamine alone, indicating that the synthesis of both glutamate and glutamine contributes to this effect. Better growth of the wild-type strain and the double-mutant was obtained in culture conditions of high aeration suggesting that substrate oxidation is a limiting process for growth on glutamine as nitrogen and carbon source. The higher glutamine content of the wild type strain was proof that the differences in growth between the wild-type and the GDH⁻;GS[±] strains were not due to a difference in the uptake of glutamine.

All the enzymes that catabolize glutamine to glutamate, or ammonium and 2-oxoglutarate were present at higher activities in the GDH⁻;GS[±] mutant compared to the wild-type when grown on glutamine as nitrogen and carbon source; however, the enzymes that assimilate ammonium were present at higher activity in the wild-type. These differences were reflected in a threefold higher ammonium excretion by the double mutant when compared with the wild-type strain.

Although a higher rate of glutamine oxidation in the GDH⁻;GS[±] strain than in the wild-strain might be expected, the higher CO₂ production by the wild-type strain can be explained if the energy from glutamine oxidation is expended on glutamine cycling in the wild-type strain, which cannot happen in the double mutant. The latter is confirmed by the higher excretion of

ammonium on glutamine as nitrogen and carbon source and the decrease of glutamine resynthesis under these conditions in the double mutant. Futile cycles may not be entirely futile since they can be considered as metabolic processes that uncouple catabolism from anabolism and, although they waste energy, they compensate for variations in the carbon supply (Tempest & Neijssell, 1987). In this sense, glutamine cycling is a futile cycle when *N. crassa* is grown on glutamine as sole nitrogen and carbon source but it is necessary in order that glutamine can be utilized as a carbon source (Hernández & Mora, 1986). The differences in growth between the wild-type and the GDH⁻; GS[±] strains can be explained as the result of sparing carbon skeletons and energy when glutamate and glutamine synthesis is severely impaired.

A higher ATP, ADP, NADH and NADPH content was observed in the GDH⁻; GS[±] strain in comparison with the wild-type strain. This suggests that consumption of ATP by GS for glutamine synthesis and NADPH by the NADP-GDH for glutamate synthesis is very high and that a mutant strain which lacks these enzyme activities can save energy which can, in turn, be used for cell growth. Moreover, when growth on ammonium is inhibited by the GS inhibitors glycine or methionine sulphoximine the intracellular concentration of ATP is higher after a short period of incubation, as compared with non-inhibited growth on ammonium (Mora *et al.*, 1988).

On the basis of the results presented here, and taking into account the absence of NADP-GDH and GS activities in the GDH⁻; GS[±] strain, we infer that glutamate that comes from glutamine by the GOGAT reaction can be preferentially degraded through the catabolic NAD-GDH to 2-oxoglutarate since less of this compound is used in glutamate and glutamine synthesis compared with the wild-type strain. In a similar way, the 2-oxoglutarate that comes from the glutamine transaminase- ω -amidase pathway can also be preferentially diverted to the tricarboxylic acid cycle instead of being used to synthesize glutamate. No glutaminase activity is found in *N. crassa* growing on glutamine as nitrogen and carbon source (Calderón *et al.*, 1985, 1989).

Although we found that the biosynthetic NADP-GDH and GS activities were very low in the wild-type strain growing on glutamine as nitrogen and carbon source, the better growth, the higher ammonium excretion and the decrease in glutamine synthesis in the GDH⁻; GS[±] strain indicates that the synthesis of glutamate and glutamine by NADP-GDH and GS is important to spare carbon skeletons and chemical energy.

We are grateful to Georgina Hernández and Yolanda Mora for their critical review of the manuscript, and to Leticia Olvera, Luz María Martínez and Dalia Terrones for technical assistance.

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

REFERENCES

- CALDERÓN, J. & MORA, J. (1985). Glutamine cycling in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **131**, 3237-3242.
- CALDERÓN, J., MORETT, E. & MORA, J. (1985). The ω -amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **161**, 807-809.
- CALDERÓN, J., COOPER, A. J. L., GELBARD, A. S. & MORA, J. (1989). ¹³N Isotope studies of glutamine assimilation *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **171**, 1772-1774.
- DANTZIG, A. H., WIEGMANN, F. L., JR & NASON, A. (1978). Regulation of glutamate dehydrogenase in nit-2 and am mutants of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **137**, 1333-1339.
- DÁVILA, G., SÁNCHEZ, F., PALACIOS, R. & MORA, J. (1978). Genetics and physiology of *Neurospora crassa* glutamine auxotrophs. *Journal of Bacteriology* **134**, 693-698.
- DÁVILA, G., LARA, M., GUZMÁN, J. & MORA, J. (1980). Relation between structure and function of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **92**, 134-140.
- ESPÍN, G., PALACIOS, R. & MORA, J. (1979). Glutamine metabolism in nitrogen starved conidia of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **104**, 233-240.
- FERGUSON, A. R. & SIMS, A. P. (1974). The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *Journal of General Microbiology* **80**, 159-171.
- FINCHAM, J. R. S. (1950). Mutant strains on *Neurospora* deficient in aminating ability. *Journal of Biological Chemistry* **181**, 61-73.
- FISCHER, R. S., BERRY, A., GAINES, G. G. & JENSEN, R. A. (1986). Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. *Journal of Bacteriology* **168**, 1146-1154.

Glutamine assimilation by *Neurospora crassa*

- HERNÁNDEZ, G. & MORA, J. (1986). Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **132**, 3315-3323.
- HUMMELT, G. & MORA, J. (1980a). NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **92**, 127-133.
- HUMMELT, G. & MORA, J. (1980b). Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **96**, 1688-1694.
- LARA, M., BLANCO, L., CAMPOMANES, M., CALVA, E., PALACIOS, R. & MORA, J. (1982). Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **150**, 105-112.
- LOMNITZ, A., CALDERÓN, J., HERNÁNDEZ, G. & MORA, J. (1987). Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **133**, 2333-2340.
- McKEAG, M. & BROWN, P. R. (1978). Modification of liquid chromatographic nucleotide analysis. *Journal of Chromatography* **152**, 253-254.
- MARZLUF, G. A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews* **45**, 437-461.
- MORA, J., SALCEDA, R. & SÁNCHEZ, S. (1972). Regulation of arginase activity by intermediates of the arginine biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **110**, 870-877.
- MORA, Y., CHIÁVEZ, O. & MORA, J. (1980). Regulation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase by carbon and nitrogen source. *Journal of General Microbiology* **118**, 455-463.
- MORA, J., CALDERÓN, J. & HERNÁNDEZ, G. (1988). Search, assimilation, and turnover of nitrogen in some fungi. In *Nitrogen Control of Metabolic Processes*, chapter 3, pp. 59-81. Edited by S. Sánchez-Esquivel. Boca Raton: CRC Press.
- SÁNCHEZ, F., CAMPOMANES, M., QUINTO, C., HANSBERG, W., MORA, J. & PALACIOS, R. (1978). Nitrogen source regulates glutamine synthetase mRNA levels in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **136**, 880-885.
- SÁNCHEZ, F., CALVA, E., CAMPOMANES, M., BLANCO, L., GUZMÁN, J., SABORIO, J. L. & PALACIOS, R. (1980). Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 2231-2234.
- TEMPEST, D. W. & NEUSELL, O. M. (1987). Growth yield and energy distribution. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*, pp. 797-806. Edited by J. L. Neidhardt, K. B. Lowe, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- VACA, G. & MORA, J. (1977). Nitrogen regulation of arginase in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **131**, 719-725.
- VICUDO, I., MORA, Y., QUINTO, C., PALACIOS, R. & MORA, J. (1978). Nitrogen regulation of glutamine synthetase in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **106**, 251-259.
- VOGEL, H. J. (1964). Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *American Naturalist* **98**, 435-446.
- WOHLHUETER, R. M., SHUTT, M. M. & HOLZER, H. (1973). Regulation of glutamine synthesis *in vivo* in *Escherichia coli*. In *The Enzymes of Glutamine Metabolism*, pp. 9-64. Edited by S. Prusiner & E. R. Stadtman. New York: Academic Press.

Discusión

El estudio de las vías que participan en la asimilación de la glutamina en N. crassa en una fuente inorgánica de nitrógeno (nitrato de amonio) se realizó marcando con L-[amido- ^{13}N] glutamina a la cepa silvestre y mutantes en las vías que participan en la asimilación de amonio de N. crassa y determinando la distribución de la radioactividad en los diferentes metabolitos nitrogenados.

El hecho de que en la cepa silvestre crecida en nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, se encuentre amonio y 2-oxoglutamato marcado (Tabla 1a), indica que la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa participa en la degradación de la glutamina a amonio en esta condición.

Una parte importante del amonio liberado de la glutamina es asimilado por la GDH-NADPH para sintetizar glutamato, como lo indica el mayor marcaje de amonio en la mutante GDH⁻ comparado con la cepa silvestre (Tabla 1a). La GS también participa en la asimilación del amonio como lo indica: a) el encontrar marcado el grupo amino de la glutamina en la cepa silvestre (Tabla 1a); el marcaje en el grupo amino se debe a que se está sintetizando glutamina a partir de glutamato marcado, y b) la disminución de la marca en glutamina, tanto en la del grupo amido como en la del amino y el aumento del marcaje en glutamato y alanina cuando se preincuba a la cepa silvestre con un inhibidor de la glutamino sintetasa (L-metionina sulfoximina) (Tabla 1a).

La GOGAT participa en la asimilación de la glutamina a

glutamato en nitrato de amonio como fuente de nitrógeno como lo indica: a) la presencia de glutamato marcado en la mutante GDH⁻ (Tabla 1a), y b) la disminución del glutamato marcado en una mutante GOGAT⁻ (Texto 1^{er} artículo). El glutamato marcado que se encuentra presente en la mutante GDH⁻ no proviene de una glutaminasa, ya que una glutaminasa sólo podría dar glutamato marcado después de que estuviera marcado el grupo amino de la glutamina y, como se muestra en la Tabla 1a, la marca del glutamato es tres veces mayor que la que se encuentra presente en el grupo amino de la glutamina. También el hecho de que en N. crassa no se ha encontrado actividad de glutaminasa (31,43) y el hecho que una doble mutante GDH⁻;GOGAT⁻ crece mal en glutamina como fuente de nitrógeno y que requiere de glutamato para crecer óptimamente, apoya la participación de la GOGAT en la síntesis de glutamato indica que las glutaminasas no participan en la degradación de la glutamina.

El mayor marcaje de glutamato y el menor marcaje de glutamina en la mutante GDH⁻ comparado con la cepa silvestre (Tabla 1a), se puede explicar por una mayor actividad de GOGAT y una mayor poza de 2-oxoglutarato en la mutante GDH⁻ (30), ya que en esta mutante se está sintetizando una mayor cantidad de glutamato por la GOGAT, mientras que en la cepa silvestre una gran parte del glutamato se sintetiza con la GDH. El hecho de que la mutante GDH⁻ tenga una mayor poza intracelular de amonio, da como resultado que en esta mutante se esté sintetizando glutamina a partir de un amonio con una menor radioactividad específica.

El mayor marcaje del grupo amino de la glutamina en la mutante

GDH⁻ comparado con la cepa silvestre se explica por la menor poza intracelular de glutamato en la mutante GDH⁻, así como el mayor marcaje en glutamato en esta mutante, lo que da como resultado una mayor radioactividad específica del glutamato.

El mayor marcaje de alanina en la mutante GDH⁻ comparado con la cepa silvestre, se puede explicar por la acumulación de piruvato a consecuencia de la acumulación de 2-oxoglutarato en esta mutante (14,30).

La distribución de la marca en la cepa silvestre después de haber marcado con L-[amido-¹³N] glutamina durante cinco minutos muestra que después de la glutamina, el compuesto más marcado es el glutamato, siguiéndole el amonio. Estos datos indican que una gran proporción de la glutamina es asimilada en glutamato y degradada a amonio en lugar de ser utilizada para la síntesis de otros compuestos nitrogenados, de los cuales la glutamina es un donador, como por ejemplo, histidina, carbamilsulfato, arginina, purinas y pirimidinas. Así, la marca en glutamato es 46 veces mayor que la de carbamilsulfato y 116 veces mayor que la de histidina, y la marca en amonio es 17 veces mayor que la de carbamilsulfato y 42 veces mayor que la de histidina, sin considerar el amonio que se ha utilizado por la síntesis de glutamato y glutamina. En la mutante GDH⁻ la marca en amonio es 76 veces mayor que la que se encuentra en carbamilsulfato.

Si consideramos que en la cepa silvestre a los cinco minutos del marcaje, el glutamato proviene de la asimilación de la glutamina por la GOGAT y sin tomar en cuenta la marca en glutamina ni la asimilación de amonio para la síntesis de

glutamato y glutamina, así como la asimilación de glutamato para la síntesis de la glutamina, se puede decir que un 62.2% de la glutamina es asimilada a glutamato por la GOGAT, que por lo menos un 22.2% de la glutamina es degradada por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa, y sólo un 15.5% del nitrógeno se deriva para la síntesis de otros compuestos nitrogenados.

La retención de más del 90% del nitrógeno marcado en glutamato y glutamina en la cepa silvestre (Tabla 1) indica que casi todo el nitrógeno está ciclando entre estos dos aminoácidos, lo que da como resultado que en este reciclaje se gaste una gran cantidad de poder reductor y energía.

Aunque en N. crassa la glutamina es convertida a 2-oxoglutarato, este aminoácido no puede ser utilizado eficientemente como fuente de nitrógeno y carbono (20). Una posibilidad para explicar esta observación podría ser que en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, operara el reciclaje de la glutamina y que diera como resultado que el poder reductor y energía en lugar de utilizarse para otras reacciones biosintéticas y crecer, se gastara en el reciclaje de la glutamina. En base a lo anterior, se probó el crecimiento de cepas con mutaciones en las enzimas que participan en la asimilación de amonio. Una doble mutante $GDH^- ; GS^+$ que carece de la actividad de deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH-NADPH) y parcialmente de la actividad de glutamino sintetasa (GS) es capaz de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono mientras que la cepa silvestre crece muy lentamente (Fig. 1A). Las mutantes sencillas GDH^- y GS^+ crecen un poco más que la cepa silvestre en esta condición, lo

que indica que tanto la síntesis de glutamato como la de glutamina participan en este efecto. La cepa silvestre es capaz de crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono cuando el cultivo se encuentra más aereado como es el caso en el que se utiliza un menor inóculo (Fig. 1B), en esta condición, la mutante $GDH^-;GS^+$ crece mejor. Si se utiliza un bajo inóculo y se disminuye la aereación, la cepa silvestre sólo presenta un crecimiento inicial y deja de crecer, mientras que la doble mutante $GDH^-;GS^+$ sólo disminuye la velocidad de crecimiento. Estos datos indican que la oxidación es un proceso limitante para la utilización de la glutamina como fuente de nitrógeno y carbono.

Las diferencias de crecimiento entre la cepa silvestre y la doble mutante $GDH^-;GS^+$ no son debido a una diferencia en el transporte de glutamina como lo muestra el mayor contenido de glutamina en la cepa silvestre (Tabla 2).

En comparación con la cepa silvestre, la doble mutante $GDH^-;GS^+$ tiene un contenido más alto de ATP, ADP, NADH y NADPH que al hacer la equivalencia en ATP del ADP, NADH y NADPH nos da casi el doble de contenido de energía química en la doble mutante $GDH^-;GS^+$ (Fig. 2). Estos resultados nos indican que el gasto de ATP por la GS y de NADPH por la GDH-NADPH es muy alto y que, cuando una mutante carece de las actividades de estas enzimas, puede ahorrar energía y utilizarla para el crecimiento celular.

Se determinaron en la cepa silvestre y en la doble mutante $GDH^-;GS^+$ las actividades enzimáticas de las enzimas que participan en la degradación de la glutamina. Como se muestra en la

Tabla 1b, la actividad de GOGAT, así como la de la transaminasa de glutamina, se encuentran presentes en glutamina como fuente de nitrógeno y en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, siendo estas actividades aproximadamente un 160% mayor en la doble mutante $GDH^-;GS^+$ comparado con la cepa silvestre en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Se intentaron varios ensayos para determinar actividad de glutaminasa en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono y no se encontró actividad en ningún caso. Estos datos indican que las vías que participan en la asimilación de la glutamina son similares, cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno o como fuente de nitrógeno y carbono (42,43).

Se determinó también la actividad de deshidrogenasa glutámica catabólica (GDH-NADH), debido a que se ha reportado que esta enzima es regulada por la fuente de carbono (49) y podría participar en la degradación del glutamato sintetizado por la GOGAT a 2-oxoglutarato y amonio. Como se muestra en la Tabla 1b, la actividad de GDH-NADH se induce más de cien veces cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno y carbono comparado cuando sólo se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno, y esta actividad en la doble mutante $GDH^-;GS^+$ es un 162% mayor que en la cepa silvestre en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono.

Se determinaron las actividades de la deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH-NADPH) y de la glutamino sintetasa en glutamina como fuente de nitrógeno y como fuente de nitrógeno y carbono. Estas enzimas son reguladas por la fuente de carbono y se reprimen en una mala fuente de carbono (20,49). En la cepa

silvestre, la GDH-NADPH así como la GS se reprimen respectivamente 57, y 6 veces cuando se crecen en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, comparado cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno. En la doble mutante $GDH^-;GS^+$ no se detecta actividad de GDH-NADPH, por lo que esta actividad es por lo menos 14 veces más alta en la cepa silvestre comparado con la doble mutante $GDH^-;GS^+$ en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. La GS se encuentra un 250% más elevada en la cepa silvestre comparada con la doble mutante $GDH^-;GS^+$ en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono.

En la doble mutante $GDH^-;GS^+$ comparada con la cepa silvestre en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono se encuentra aproximadamente un 160% más actividad de las enzimas que participan en el catabolismo de la glutamina a 2-oxoglutarato y amonio mientras que en la cepa silvestre se encuentra una mayor actividad de las enzimas que participan en la asimilación de amonio, lo que da como resultado que la doble mutante tenga ligeramente aumentada su capacidad para degradar glutamina a amonio y 2-oxoglutarato, y disminuída la asimilación de estos compuestos. Así como se muestra en la Tabla 3, la doble mutante $GDH^-;GS^+$ excreta casi tres veces más amonio por miligramo de proteína que la cepa silvestre. Las mutantes sencillas GDH^- y GS^+ excretan más amonio que la cepa silvestre y menos que la doble mutante $GDH^-;GS^+$, lo que indica que tanto la GDH como la GS participan en la asimilación del amonio que proviene de la degradación de la glutamina cuando se utiliza este aminoácido como fuente de nitrógeno.

La demostración in vivo de las enzimas que participan en la asimilación de la glutamina se realizó midiendo la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamina en la cepa silvestre y en una mutante que carece de la actividad de GOGAT en presencia de aminooxiacético (AOA) que es un inhibidor de las transaminasas o de 6-diazo-5-oxo-L-norleucina que es un inhibidor de transaminasas que también inhibe a la ω -amidasa. Como se muestra en la Tabla 1, la mutante GOGAT libera un 39% de $^{14}\text{CO}_2$ comparado con la cepa silvestre, lo que demuestra la participación de la GOGAT en la asimilación de la glutamina a glutamato, así como indica el papel de la GDH-NADP en la degradación del glutamato formado a 2-oxoglutarato y amonio. En la cepa silvestre como en la mutante GOGAT⁻ la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamina es inhibida por AOA y DON, lo que indica que la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasa participa en la degradación de la glutamina a 2-oxoglutarato y amonio.

Como se muestra en la Tabla 5, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glutamina en las mutantes GDH⁻,GS⁺ y GDH⁻;GS⁺ es mayor que la cepa silvestre; sin embargo, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ por miligramo de proteína en la doble mutante GDH⁻;GS⁺ es menor que en la cepa silvestre. Estos resultados indican que en la doble mutante GDH⁻;GS⁺, aunque hay una mayor degradación de glutamina a amonio (Tabla 3), el 2-oxoglutarato que se forma no se utiliza para oxidarse y dar más poder reductor y por lo tanto energía, sino que éste se deriva para la síntesis de otros compuestos orgánicos y crecer. De tal manera que en esta doble mutante GDH⁻;GS⁺, el ahorro de NADPH y ATP para la síntesis de glutamato y

glutamina es alto y ahora estos son utilizados para otras reacciones biosintéticas y para crecer.

La síntesis de glutamina cuando el hongo se crece en este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono se demuestra a través de marcar con $[U-^{14}C]$ glutamato y determinar la marca en glutamina. Como se muestra en la Tabla 6, se encuentra marcada la glutamina en la cepa silvestre y esta marca disminuye en la mutante GS^+ y aún más en la doble mutante $GDH^-;GS^+$. Estos resultados demuestran que, no obstante que la actividad de GS es muy baja en la cepa silvestre en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, existe síntesis de glutamina y que aunque la diferencia de actividad de GS de la cepa silvestre y la doble mutante es de un 250%, estos resultados muestran que la síntesis de glutamina es 13 veces menor en esta doble mutante. El hecho de que en la doble mutante $GDH^-;GS^+$ exista una menor síntesis de glutamina que en la mutante GS^+ indica que la síntesis de glutamato por la GDH es importante para aumentar la poza de glutamato y para que éste se derive para la síntesis de glutamina. Así, se puede observar en la Tabla 2 que en la mutante GS^+ , la poza de glutamato es 166% mayor que en la doble mutante $GDH^-;GS^+$.

Los resultados reportados en este trabajo muestran que en N. crassa en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono, este aminoácido es degradado a amonio y 2-oxoglutarato por la GOGAT y la GDH-NADH y por la vía de la transaminasa de glutamina- ω -amidasas, y aunque las actividades de la GDH-NADPH y de la GS están muy bajas en esta condición, existe una considerable síntesis de glutamato y glutamina por estas enzimas, dando lugar a un ciclo

en el cual la glutamina es degradada y resintetizada que da como resultado que el 2-oxoglutarato no se deriva hacia el ciclo de Krebs y su metabolismo a otros compuestos orgánicos, así como a un gasto fútil de poder reductor (NADPH) y energía (ATP).

Es interesante mencionar que en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono las vías que participan en la degradación de la glutamina a 2-oxoglutarato (GOGAT-GDH-NADH, transaminasa de glutamina- ω -amidasa) requieren de un 2-oxoácido para que se lleven a cabo, a diferencia de lo que podría ser la operación de una glutaminasa y una GDH-NADH como puede suceder en otros microorganismos (31,50). Una posible ventaja de que N. crassa utilice estas vías para degradar glutamina a 2-oxoglutarato, podría ser la de degradar glutamina sin depletar las pozas de aminoácidos, ya que es necesario para que estas vías funcionen óptimamente una poza de 2-oxoácidos y además que en el primer paso de estas vías se sintetiza un aminoácido.

El reciclaje de la glutamina cuando el hongo se crece en este aminoácido como fuente de nitrógeno y carbono puede considerarse como un ciclo fútil, así el bloqueo de este ciclo da como resultado que la glutamina se utilice eficientemente como fuente de nitrógeno y carbono. Sin embargo, el reciclaje de la glutamina en N. crassa puede tener una función importante cuando se utiliza una buena fuente de carbono como lo muestra el hecho de que al bloquear la síntesis de glutamina disminuye el catabolismo de carbono de la sacarosa (46). Se ha propuesto que el gasto de ATP por la GS y la regulación del metabolismo de carbono por la carga energética pueden ser los puntos de interacción en la regulación

coordinada del metabolismo de nitrógeno y carbono (46). En B. subtilis se ha reportado que mutantes totales de la GS dan como resultado una utilización pobre de la glucosa como fuente de carbono y la expresión de varios genes sujetos a la represión catabólica por glucosa (51). Esto sugiere que este mecanismo de regulación coordinada puede ser general.

Los procesos cíclicos son comunes en el metabolismo celular, éstos funcionan en oxidaciones y síntesis, en la generación de energía, poder reductor y en el transporte de una variedad de compuestos a través de membranas (45). Sin embargo, existen ciclos en los cuales la función no es aparente, como es el caso cuando una reacción para la síntesis y degradación de un compuesto es catalizado por diferentes enzimas y donde la síntesis consume ATP. Estos ciclos causan una hidrólisis de ATP sin el correspondiente cambio de reactantes, por lo cual a estos ciclos se les ha identificado con el nombre de ciclos fútiles (45). En el metabolismo de carbohidratos existen tres ciclos en tejidos gluconeogénicos: a) el de glucosa y glucosa 6 fosfato, b) el de fructosa 6 fosfato y fructosa 1,6 difosfato, y c) el de fosfoenol piruvato y piruvato.

El reciclaje de un compuesto puede tener la función en el control metabólico de amplificar los efectos de ligandos alostéricos, así por ejemplo la fosfofructoquinasa es inhibida por ATP, mientras que la fructosa difosfatasa es inhibida por AMP; de tal manera, una baja cantidad de ATP y una alta cantidad de AMP da como resultado la síntesis de fructosa 1,6 difosfato y su utilización en la glicólisis (55). En las abejas zumbadoras se

ha reportado que el reciclaje de fructosa 1,6 difosfato tiene un papel importante en la termogénesis del músculo que utilizan para volar (52).

En estudios realizados en E. coli se ha calculado teóricamente que en glucosa como fuente de carbono una mol de ATP da 28.8 gramos de peso seco de células. Sin embargo, los rendimientos experimentales son sólo un 50% de los teóricos (45). Gunsalus y Shuster (54) postularon la posible disipación de energía por un mecanismo de ATPasa. Harder (55) propuso que para que la energía biológica se convierta bien, tiene que trabajar en condiciones de máximo rendimiento de energía y por lo tanto tiene que funcionar a una baja eficiencia, como es el caso de una máquina de vapor. La aplicación de la termodinámica de sistemas en no equilibrio a la conversión de energía en sistemas vivos concuerdan con este postulado (56), de tal manera que debe haber procesos que consumen el exceso de energía, así, se ha propuesto que los ciclos fútiles pueden funcionar como reacciones disipadoras de energía (45).

Referencias.

1. Mora, J., J. Calderón, and G. Hernández. 1988. Nitrogen source control of microbial processes, S. Sánchez-Esquivel Ed., CRC Press, Inc. p. 59.
2. Blumenthal, K.M., and E.L. Smith. 1973. J. Biol. Chem. 248: 6002.
3. Holder, A.A., J.C. Wotton, A.J. Baron, C.K. Chambers, and J.R.S. Fincham. 1975. Biochem. J. 149:757.
4. Brelt, M., G.K. Chambers, A.A. Holder, J.R.S. Fincham, and J.C. Wotwon. 1976. J. Mol. Biol. 106:1.
5. Fincham, J.R.S., and A.J. Baron. 1977. J. Mol. Biol. 110:627.
6. Seale, T.W., M. Brett, A.J. Baron, and J.R.S. Fincham. 1977. Genetics. 86:261.
7. Sidding, M.A.M., J.A. Kinsey, J.R.S. Fincham, and M. Keighren. 1980. J. Mol. Biol. 137:125.
8. Kinnaird, J.H., M.A. Keighren, J.A. Kinsey, M. Eaton, and J.R.S. Fincham. 1982. Gene. 20:387.
9. Hernández, G., R. Sánchez-Pescador, R. Palacios, and J. Mora. 1983. J. Bacteriol. 154:524.
10. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:127.
11. Viruela, P.J., and M. Kapoor. 1986. J. Gen. Microbiol. 132:907.
12. Dávila, G., M. Lara, J. Guzmán, and J. Mora. 1980. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:134.
13. Sánchez, F., E. Calva, M. Campomanes, L. Blanco, J. Guzmán,

- J.L. Saborío, and R. Palacios. 1980. J. Biol. Chem. 225:2231.
14. Limón-Lason, J., M. Lara, B. Reséndiz, and J. Mora. 1977. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:1234.
15. Lara, M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, R. Palacios, and J. Mora. 1982. J. Bacteriol. 150:105.
16. Dávila, G., S. Brom, Y. Mora, R. Palacios, and J. Mora. 1980. J. Bacteriol. 156:990.
17. Vichido, I., Y. Mora, C. Quinto, R. Palacios, and J. Mora. 1978. J. Gen. Microbiol. 106:251.
18. Quinto, C., J. Mora, and R. Palacios. 1977. J. Biol. Chem. 252:8724.
19. Sánchez, F., M. Campomanes, C. Quinto, W. Hansberg, J. Mora, and R. Palacios. 1978. J. Bacteriol. 106:880.
20. Mora, Y., O. Chavez, and J. Mora. 1980. J. Gen. Microbiol. 118:445.
21. Hernández, G., Y. Mora, and J. Mora. 1980. J. Bacteriol. 165:133.
22. Aguirre, J., and W. Hansberg. 1986. J. Bacteriol. 166:1040.
23. Tate, S.S., and A. Meister. 1973. The enzymes of glutamine metabolism, S. Prusiner and E.R. Stadman Ed., Academic Press Inc. New York. p. 77.
24. Powers, S.G., and A. Meister. 1978. J. Biol. Chem. 253:800.
25. Meister, A., and S.G. Powers. 1978. Adv. Enz. Reg. 16:287.
26. Meister, A.. 1980. Glutamine metabolism, enzymology and regulation, J. Mora and R. Palacios Ed., Academic Press Inc. p. 1.
27. Freese, E., S.W. Park, and M. Casbel. 1964. Proc. Nat. Acad.

- Sc. 51:1164.
28. Tempest, D.W., J.L. Meers, and C.M. Brown. 1970. J. Biochem. 117:407.
 29. Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Biochem. Biophys. Res. Comun. 96:1688.
 30. Lomnitz, A., J. Calderón, G. Hernández, and J. Mora. 1987. J. Gen. Microbiol. 133:2330.
 31. Imada, A., K. Igarasi, K. Nakahama, and M. Isono. 1973. J. Gen. Microbiol. 76:85.
 32. Prusiner, S., and E.R. Stadman. 1971. Biochem. Biophys. Res. Comun. 44:1474.
 33. Cooper, A.J.L., and A. Meister. 1977. Crit. Rev. in Biochem. 4:251.
 34. Cooper, A.J.L., and A. Meister. 1981. Comp. Biochem. Physiol. 698:137.
 35. Kretovich, W.L.. 1958. Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem. 20:319.
 36. Cambell, L.L.. 1956. J. Bacteriol. 71:81.
 37. Soberón, M., and G. González. 1987. J. Gen. Microbiol. 133:9.
 38. Kilby, B.A. and E. Neville. 1956. Biochem. Biophys. Acta. 19:383.
 39. Thayer, P.S., and N.H. Horowitz. 1951. J. Biol. Chem. 192:755.
 40. Sikora, L., and G.A. Marzluf. 1984. Mol. Gen. Genet. 183:33.
 41. Espín, G., R. Palacios, and J. Mora. 1979. J. Gen. Microbiol. 115:59.
 42. Calderón, J., E. Morett, and J. Mora. 1985. J. Bacteriol.

- 161:807.
43. Calderón, J., and J. Mora. 1985. J. Gen. Microbiol. 131:3237.
 44. Marluf, G.A.. 1981. Microbiol. Rev. 45:437.
 45. Katz, J., and R. Rognstand. 1976. Curr. Top. Cell. Reg. 10:237.
 46. Hernández, G., and J. Mora, 1986. J. Gen. Microbiol. 132:3315.
 47. Mora, Y., G. Espín, K. Willms, and J. Mora. 1979. J. Gen. Microbiol. 104:241
 48. Espín, G., and J. Mora. 1978. J. Gen. Microbiol. 104:233.
 49. Dantzing, A.H., F.L. Jr. Wiegman, and A. Nason. 1978. J. Bacteriol. 137:1333.
 50. Prusiner, S. 1973. The enzymes of glutamine metabolism. S. Prusiner and E.R. Stadtman Ed., Academic press Inc. New York, p.797.
 51. Fisher, S.H., and A.L. Soneshein, 1984. J. Bacteriol. 157:612.
 52. Newsholme, E.A., B. Crabtree, S.J. Higgins, S.D. Thornton, and C. Start. 1972. Biochem. J. 128:89.
 53. Tempest, D.W., and O.M. Neijssel. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology. J.L. Neidhardt, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p.797.
 54. Gunsalus, I.C., and C.W. Shuster.1961. The Bacteria. Vol. 2. I.C. Gunsalus and R.Y. Stainer Ed., Academic Press, Inc., New York. p.1.

55. Harder, W., J.P. van Dijken, and J.A. Roeles. 1981. Microbial growth on C₁ compounds. H. Dalton Ed., Heyden and Son Ltd., London. p.258.
56. Westerhoff, H.V., J.S. Lolkema, O. Otto, and K.J. Hellingwerf. 1982. Biochim. Biophys. Acta. 683:181.