



Universidad Nacional Autónoma de México

Estrategias moleculares que tiene Rhizobium phaseoli para
manejar el nitrógeno en vida libre

T E S I S

Para obtener el Título de
Lic. en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a

MA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

Asesor: Dr. Jaime Mora Celis

Cuernavaca, Mor.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

A mi mamá
con mucho cariño

" Digamos que estaba poniendo a prueba los límites de la realidad, tenía curiosidad de ver que sucedería, solo era eso simple-curiosidad "

Jim Morrison.

Agradecimientos

Al Dr. Jaime Mora quisiera agradecerle en manera muy especial por todo el tiempo que me ha dedicado, por el apoyo y entusiasmo en mi trabajo que hizo que este año no solo fuera probechoso en mi formación sino tambien muy placentero.

Tambien quisiera agradecer a mis maestros Alicia Gonzalez y Dr. Fernando Bastarrachea por su interes durante mi estancia en sus laboratorios.

A Guadalupe Espin por su discusión y participación en la -realización de este trabajo.

Además agradezco a Gloria Soberón, Alicia Gonzalez, Rafael Palacios, Fernando Bastarrachea y Georgina Hernandez por haber revisado y discutido conmigo esta tesis.

A todas aquellas personas que participaron durante toda la licenciatura en mi formación profesional.

A mis compañeros de generación y a mis amigos del CIFN. Especialmente a David Enriquez y a Enrique Morett.

Tambien a Mario, con mucho cariño por haber compartido y -mejorado todos los momentos en la realización de mi tesis.

A Concepción Hernandez por la transcripción de este trabajo.

Alejandra Bravo.

INDICE:

INTRODUCCION	1
1.- Importancia de la fijación biológica del nitrógeno	1
2.- Ciclo de vida de <i>Rhizobium</i>	2
a) Población en la rhizosfera	2
b) Infección	3
c) Proliferación y desarrollo del nódulo	5
d) Diferenciación a bacteroide	6
d-1) Cambios en la composición de la pared	6
d-2) Cambios en la capacidad de oxidar sustratos respiratorios	6
d-3) Síntesis de leghemoglobina	7
d-4) Síntesis de leghemoglobina	8
d-5) Inactivación de la asimilación de amonio	8
d-6) Excreción de amonio	8
d-7) Pérdida de la viabilidad	9
3.- Estructura y regulación de la expresión de la nitrogenasa	9
a) Estructura	9
b) Regulación de la expresión de la nitrogenasa	10
c) Fijación de nitrógeno en vida libre	14
4.- Asimilación de amonio	16
a) Vías de asimilación de amonio en microorganismos	16
b) Asimilación de amonio en <i>Rhizobium</i>	20
c) Actividades de glutamino sintetasa en <i>Rhizobium</i>	21

OBJETIVOS	27
MATERIALES Y METODOS	30
1.- Cepas	30
2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	30
3.- Determinaciones enzimáticas	30
4.- Determinaciones de amonio	34
RESULTADOS	36
1.- Determinación de las condiciones de ensayo de las actividades de las enzimas de asimilación de amonio	36
2.- Regulación de las enzimas de asimilación de amonio en <i>Rhizobium phaseoli</i>	38
a) Regulación de la actividad de la glutamato sintasa en diferentes fuentes de nitrógeno.	39
b) Regulación de las actividades de las dos glutamino sintetasas en diferentes fuentes de nitrógeno.	39
3.- Inactivación de la glutamino sintetasa II de <i>Rhizobium phaseoli</i>	46
4.- Características de las células que han alcanzado la fase estacionaria del crecimiento.	49
a) Inactivación de las glutamino sintetasas.	50
b) Excreción de amonio al medio	50
c) Pérdida de la viabilidad	51
DISCUSION	55
REFERENCIAS	65
FIGURAS	
TABLAS	

INTRODUCCION.

1.- IMPORTANCIA DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO.

El nitrógeno (N_2) es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, representa el 80% de los gases que la forman; sin embargo las plantas y los animales son incapaces de utilizarlo para crecer, solo las bacterias fijadoras de nitrógeno lo usan, reduciendolo a NH_3 , aumentando de esta manera la cantidad de formas nitrogenadas útiles en la biosfera. A la conversión de N_2 en NH_3 se le denomina fijación biológica de nitrógeno.

Las plantas asimilan los compuestos nitrogenados inorgánicos que se encuentren en el suelo, transformándolos en componentes nitrogenados celulares, tales como protefnas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas importantes; las protefnas sintetizadas por las plantas son utilizadas por los animales como fuente de nitrógeno. Estos organismos devuelven el nitrógeno al suelo en forma de productos de excreción (urea, ácido úrico, etc.) o como productos de putrefacción después de su muerte.

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

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

2.- CICLO DE VIDA DE *Rhizobium*:

Entre las bacterias capaces de fijar nitrógeno se encuentran las del género *Rhizobium* de la familia de las *Rhizobiaceas*, *Rhizobium* son bacterias gram negativas que se encuentran en el suelo y se caracterizan por su capacidad de entrar en simbiosis con algunas leguminosas, induciendo el desarrollo de nódulos en las raíces. Dentro de los nódulos se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico; el nitrógeno fijado por *Rhizobium* es excretado en forma de amonio hacia el citosol de la célula vegetal, en donde es asimilado por las enzimas codificadas por la planta. Como producto de la asociación la leguminosa asimila el nitrógeno atmosférico por esto es de gran importancia el estudio de la simbiosis de *Rhizobium* con las leguminosas, como un problema básico a investigar como se muestra en la figura 1, el ciclo de vida de *Rhizobium* consiste en:

a) Población en la rizosfera, formada por las bacte--

rias creciendo en vida libre.

b) Infección de la planta por algunas de estas bacterias.

c) Proliferación de las bacterias dentro de la planta y formación del nódulo.

d) Diferenciación de las bacterias dentro del nódulo a bacteroide; hay evidencias que indican que los bacteroides pierden la viabilidad (15).

e) Senescencia del nódulo y de la planta.

a) Población en la rizosfera.- Las plantas leguminosas permiten el desarrollo de poblaciones de *Rhizobium* en vida libre que se encuentran en la vecindad de sus raíces.

Se ha visto que una planta de chícharo creciendo en 200 ml de medio, sin fuente de carbono ni de nitrógeno, provee suficientes nutrientes como para que mutantes auxótrofas de *Rhizobium leguminosarum* crezcan de 10^2 a 10^8 células por ml, en un tiempo de dos semanas (1).

b) Infección.- El primer paso en la infección es el reconocimiento específico entre la bacteria y la planta. Las especies de *Rhizobia* se han definido según su capacidad de infectar a las diferentes leguminosas, así *Rhizobium trifolii* infecta a las especies de *Trifolium*, *Rhizobium phaseoli* infecta a las especies

de *Phaseolus*, *Rhizobium leguminosarum* infecta a las especies de *Pisum*, *Vicia* y *Lens*. Generalmente una especie de *Rhizobium* infecta a una sola especie o a especies muy relacionadas de leguminosas, aunque se han encontrado excepciones.

La especificidad de la infección se cree que ocurre -- como resultado del contacto y la unión selectiva entre *Rhizobium* y la raíz de la planta. Se ha propuesto un modelo en cual se sugiere que glicoproteínas presentes en los pelos de la raíz, llamadas lectinas, son capaces de unirse a residuos azúcares específicos presentes en la superficie de las bacterias. De esta manera las lectinas funcionan como puentes para unir sitios antígenicos en la superficie de la bacteria y en la pared celular de la planta (2). Algunos de estos determinantes antígenicos se han identificado, así por ejemplo se ha visto que la N-acetil-D-galactosamina bloquea la unión de *Rhizobium japonicum* a los pelos de la raíz de soya y que la 2-deoxiglucosa bloquea la unión de *Rhizobium trifolii* a trebol, sugiriendo que estos azúcares se encuentran en la superficie de la bacteria y son reconocidos específicamente por las lectinas de los pelos de la raíz (3).

También existen evidencias que sugieren que los exopolisacaridos de *Rhizobium* son reguladores de la infección, ya que mutantes de *Rhizobium leguminosarum* que producen menos exopolisacaridos no pueden nodular (3). Parece ser que el enroscamiento de la punta de la raíz, que es de los primeros eventos en la

penetración, se debe a la presencia de los exopolisacáridos liberados por *Rhizobium* (3).

c) Proliferación y desarrollo del nódulo.- Existe otra diferente clasificación de los *Rhizobia* basada en sus tiempos de generación, que los divide en dos grupos: los *Rhizobia* de crecimiento rápido y los *Rhizobia* de crecimiento lento (4).

Estos dos tipos de *Rhizobia* tienen diferentes mecanismos de penetración a la raíz:

1.- Los *Rhizobia* de crecimiento rápido se adhieren a la superficie de la raíz y forman un hilo infectivo al invaginarse la pared celular de la planta. Este hilo infectivo crece a través de la corteza de la raíz, mediante la extensión de la pared primaria; antes de que las bacterias entren en contacto con las células corticales en las cuales se van a alojar los bacteroides, estas son estimuladas a dividirse para formar el nódulo. El hilo infectivo continúa su crecimiento hasta alcanzar las células corticales en las que las bacterias envueltas en una vacuola de membrana celular penetran en el citosol.

2.- Los *Rhizobia* de crecimiento lento se caracterizan por la ausencia del hilo infectivo, el acceso a los tejidos -- centrales se lleva a cabo por penetración intracelular, particularmente cuando la epidermis es dañada o donde emergen raíces laterales.

Una vez que la raíz ha sido penetrada, se estimula a las células corticales a dividirse y las bacterias son tomadas por las células que se están dividiendo, quedando al igual que los *Rhizobium* de vida rápida, envueltas en una vacuola de membrana.

d) Diferenciación a bacteroide.- Las bacterias presentes en las células del nódulo, se encuentran envueltas en una membrana, es aquí donde se van a diferenciar a bacteroides. El número de bacteroides por vacuola depende de la planta, puede ser uno solo por vacuola o se puede encontrar de 3 a 16 bacteroides por vacuola (3).

Las bacterias que se diferencian a bacteroide son las que pueden llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Los bacteroides además de expresar la nitrogenasa tienen otras características diferentes a las bacterias en vida libre. Entre estas características se encuentran las siguientes:

1.- Cambio en la composición de la pared.- La composición de la pared de los bacteroides cambia, volviéndose menos rígida y más delgada.

2.- Cambio en la capacidad de oxidar substratos respiratorios.- Los bacteroides cambian su capacidad de oxidar substratos respiratorios, ya que pueden oxidar ácidos orgánicos y pierden la capacidad de oxidar hexosas y triosas fosfato (5, 6).

Se ha propuesto que el succinato es el sustrato respiratorio de los bacteroides, se cree que de su catabolismo se obtiene la energía necesaria para la fijación de nitrógeno, ya que mutantes deficientes en la actividad de succinato deshidrogenasa en *Rhizobium meliloti* presentan nodulación retardada, formando nódulos blancos e incapaces de fijar nitrógeno (7). Además se ha visto que mutantes alteradas en el transporte de ácidos tricarbónicos forman nódulos inefectivos para la fijación de nitrógeno (8). En cambio mutantes incapaces de metabolizar glucosa, nodulan y fijan nitrógeno a los mismos niveles que la cepa silvestre (9). Por otra parte se ha observado que el succinato puede inducir cambios en la morfología y en la viabilidad de *Rhizobium trifolii*, haciendo que las células se hinchen y dejen de dividirse, aunque no se ha probado si esta pérdida de la capacidad de dividirse continúa al ser transferidas las células a un medio sin succinato (10).

3.- Síntesis de leghemoglobina.- La leghemoglobina es una proteína que une oxígeno reversiblemente con gran afinidad (11). Esta proteína es de suma importancia para el proceso de fijación de nitrógeno, ya que la nitrogenasa se inactiva por oxígeno. *Rhizobium* es un microorganismo aerobio estricto por lo tanto requiere oxígeno para obtener la energía necesaria para sus usos metabólicos; así la leghemoglobina difunde oxígeno a las bacteroides, con un flujo que permite el funcionamiento del metabolismo aeróbico y al mismo tiempo mantiene la con-

centración de oxígeno suficientemente baja para que la nitrógenasa pueda funcionar. La síntesis de la leghemoglobina es resultado de la simbiosis, ya que el grupo hemo es sintetizado por el bacteroide, mientras que el grupo proteico es sintetizado por la planta (11).

4.- Síntesis de hidrogenasa.- Otra proteína que se sintetiza por algunas cepas de *Rhizobium* en los nódulos, es la hidrogenasa. Esta proteína es importante para aumentar la eficiencia de la fijación de nitrógeno, debido a su capacidad de reciclar el hidrógeno que se libera por la acción de la nitrógenasa (12); se calcula que del 20 al 40 por ciento de la energía utilizada por la nitrógenasa se pierde mediante la producción de H_2 . Por la acción de la hidrogenasa se oxida O_2 , se produce ATP y además se protege a la nitrógenasa del efecto inhibitorio del oxígeno.

5.- Inactivación de la asimilación de amonio.- Los bacteroides tienen reprimidas las enzimas que se encargan de la asimilación de amonio (13). En base a estos datos se ha propuesto que los bacteroides son incapaces de asimilar el nitrógeno que fijan.

6.- Excreción de amonio.- Como los bacteroides no asimilan el amonio, el nitrógeno fijado es excretado al citosol de la planta. Mediante estudios con $^{15}N_2$ en *Rhizobium japonicum*, midiendo la cantidad de amonio marcado en el sobrenadante, se

ha observado que el 94% del amonio producido por la nitrogenasa es excretado (14).

7.- Pérdida de la viabilidad.- Cuando los bacteroides - pasan cierto estado de desarrollo pierden la viabilidad. Se propone que la diferenciación a bacteroide resulta del contacto -- con el ambiente intracelular del nódulo y que los bacteroides - más viejos son incapaces de dividirse debido al prolongado contacto con las altas concentraciones de ácidos orgánicos presentes en el citoplasma (15). Existe cierta controversia sobre la viabilidad de los bacteroides, ya que se pueden aislar bacterias viables de los nódulos; se discute si estas bacterias provienen de bacteroides totalmente diferenciados o de bacterias atrapadas en el hilo infectivo.

Se puede decir que la diferenciación de bacteria a bacteroide es un evento suicida individualmente, pero altruista -- colectivamente, ya que la actividad del bacteroide va a permitir la proliferación de las demás bacterias en vida libre permitiendo que la planta crezca y que por lo tanto aumenten los exudados de la raíz pero sin lograr la sobrevivencia del mismo bacteroide.

3.- ESTRUCTURA Y REGULACION DE LA EXPRESION DE LA NITROGENASA

a) Estructura

La nitrogenasa es la enzima que cataliza la reducción

de N_2 en NH_3 . Está formada por dos componentes, los cuales no tienen capacidad de fijar nitrógeno por separado (16).

El componente I o proteína Fe-Mo, tiene un peso molecular de 200,000 daltones, está formada por dos tipos de polipeptidos que se estructuran en forma de un tetrámero, compuesto por dos polipéptidos de cada tipo. Además contiene uno a dos átomos de molibdeno y unos veinte a treinta átomos de hierro.

El componente II o proteína Fe, tiene un peso molecular de 50,000 daltones, está formada por dos subunidades idénticas, contiene de uno a cuatro átomos de hierro.

La proteína II es reducida por algún donador de electrones (ferredoxinas, flavodoxinas, NADPH) en el estado reducido una molécula de Mg-ATP, esta unión resulta en un cambio conformacional que ahora permite la interacción con la proteína I, y por lo tanto la capacidad de transferir los electrones de el componente II al componente I, este evento está acoplado con la hidrólisis del ATP. La proteína I reducida puede a su vez reducir el N_2 . Así la reducción del nitrógeno molecular se lleva a cabo en la subunidad I de la nitrogenasa, dando como resultado NH_3 y H_2 (17) (Fig. 2).

Se requiere un gasto de cuatro a cinco ATP por cada par de electrones transferidos, esto da un gasto total de 12 a 15 ATP para reducir una molécula de N_2 en $2NH_3$.

b) Regulación de la expresión de la nitrogenasa.

Los estudios iniciales en *Klebsiella pneumoniae* hicieron que se pensara que la glutamino sintetasa per se tuviera un papel importante en la regulación de la fijación de nitrógeno de este microorganismo. Sin embargo estudios posteriores -- han demostrado que la glutamino sintetasa y la nitrogenasa, se encuentran bajo una regulación común en la mayoría de las bacterias gram negativas.

Cuando el amonio se encuentra en bajas concentraciones, la glutamino sintetasa se encuentra desadenilada (forma activa) en estas condiciones se induce el funcionamiento de la nitrogenasa (18). En *Klebsiella pneumoniae* se ha observado que una mutante monogenica, constitutiva en la síntesis de la glutamino sintetasa, sintetiza nitrogenasa en condiciones donde se encuentra reprimida en la cepa silvestre (18). También se ha encontrado, que auxótrofos de glutamina ($glnA^-$) que no producen glutamino sintetasa son incapaces de sintetizar nitrogenasa en condiciones de limitación de amonio. Además se ha observado que -- si complementan el fenotipo gln^- con un episoma que lleva la -- información para la glutamino sintetasa, se recupera la actividad de la glutamino sintetasa y también la capacidad de sintetizar nitrogenasa (18). Estos datos llevaron a que se propusiera que la proteína de la glutamino sintetasa es la que regula a la nitrogenasa, pero esta interpretación resultó ser incorrecta ya que como se verá más adelante el mismo resultado se explica debido a que la síntesis de la glutamino sintetasa y

de la nitrogenasa se encuentran bajo una regulación común, donde el efector es la glutamina o algún metabolito relacionado con ella.

Shanmugan ha mostrado que ciertos aminoácidos, especialmente la glutamina en combinación con aspartato y glutamato, son capaces de reprimir la síntesis de la nitrogenasa en mutantes de *Klebsiella pneumoniae* donde no se reprima por amonio. Este autor concluye que la represión por amonio de la nitrogenasa es un efector producido por algún producto de algún aminoácido (19). Además estudios de pozas de aminoácidos en *Klebsiella pneumoniae* durante la represión y desrepresión de la nitrogenasa, han demostrado una correlación entre la concentración de glutamina y la actividad de la nitrogenasa (20).

Por otro lado se ha encontrado que en *Klebsiella pneumoniae* el control de la transcripción de la nitrogenasa está determinado por un sistema de cascada que incluye proteínas reguladoras codificadas por genes *nif*, así como proteínas reguladoras del metabolismo nitrogenado (Ntr). Entre estas últimas se encuentran las proteínas reguladoras de la síntesis de la glutamino sintetasa, las cuales también participan en la regulación de la transcripción de otros sistemas sujetos a regulación por nitrógeno, como la utilización de aminoácidos, el transporte de aminoácidos y la fijación de nitrógeno (21).

Dos de estas proteínas reguladoras de los sistemas Ntr,

se encuentran formando parte de un operón junto con el gene gln A que es el gene estructural de la glutamino sintetasa -- (operon gln G gln L gln A). El gene gln L contiguo a gln A codifica para un producto que funciona como represor de la síntesis a partir de gln A (22). El gene gln G codifica para un producto al cual se le ha asignado un papel dual en la regulación, ya que es necesario para la activación como para la represión del gene gln A (23).

El gene gln F no forma parte de este operón y se ha encontrado que el producto de este gene, es necesario para la expresión de gln A, así como para la expresión de los sistemas Ntr.

Se sugiere que los productos de gln F y gln G son necesarios para activar la transcripción de diferentes operones -- bajo el control Ntr (23) y que para reprimir estos operones se necesitan los productos de gln L y gln G (24).

Los genes de fijación de nitrógeno descritos en *Klebsiella pneumoniae* son 17 y están organizados en 7 operones. Uno de estos operones (nif L, nif A) contienen dos genes necesarios para la regulación de la transcripción de los otros operones nif. Así el producto de nif A funciona como activador de la -- transcripción de los operones nif (25) y el producto de nif L funciona como represor (26).

El operón nif L A también está bajo el control Ntr.

Es por esto que la regulación de la expresión de la enzima glutamino sintetasa esta relacionada con la regulación de la nitrogenasa (Fig. 3).

En cuanto a la regulación de la nitrogenasa en *Rhizobium* se entiende muy poco, se sabe que mutantes auxótrofos de glutamina en *Rhizobium cowpea* y en *Rhizobium meliloti* son incapaces de fijar nitrógeno (27, 28) sin embargo, estas mutantes probablemente son mutaciones regulatorias por lo que la incapacidad de fijar nitrógeno puede no estar directamente relacionada con la síntesis de la proteína de la glutamino sintetasa. El estudio de la fijación de nitrógeno en *Rhizobium* fuera de los nódulos es muy importante para entender la regulación de la nitrogenasa en esta bacteria.

c) Fijación de nitrógeno en vida libre.

Se ha tratado de expresar la nitrogenasa en cultivos de *Rhizobium*. Sin el contacto con la planta, se han usado diferentes medios de cultivo, y se ha logrado hacer que los *Rhizobium* de crecimiento lento fijen nitrógeno en vida libre. Los medios de cultivo utilizados contienen bajas tensiones de oxígeno, glutamina como fuente de nitrógeno y dos fuentes de carbono: succinato y arabinosa. Se ha visto que células capaces de expresar la nitrogenasa, cambian su estado metabólico a uno -- donde no crecen, donde la asimilación de amonio está bloqueada y excretan amonio (29). No se ha llegado a tener las condicio-

nes en las que *Rhizobía* de crecimiento rápido fijan nitrógeno atmosférico en ausencia de la planta.

Resulta muy interesante preguntarse ¿cuáles son las diferencias entre *Rhizobía* de crecimiento lento y de crecimiento rápido que permiten la expresión de la nitrogenasa?. Los *Rhizobía* de crecimiento lento se diferencian de los de crecimiento rápido por su incapacidad para utilizar ciertas fuentes de carbono como disacáridos (sacarosa y lactosa) o algunos intermediarios del ciclo de ácidos tricarbóxicos (malato y fumarato). Además de que la vía Enter-Doudoroff opera a una velocidad menor, se ha encontrado que tienen menor capacidad de síntesis de NADPH ya que la enzima NADP-glucosa 6 fosfato deshidrogenasa tiene una actividad 10 veces menor en comparación con los *Rhizobía* de crecimiento rápido, y la enzima NADP-6 fosfogluconato deshidrogenasa no está presente (30), posiblemente estas diferencias en la capacidad de sintetizar NADPH sea un factor importante para determinar la velocidad de crecimiento y para que se den condiciones intracelulares necesarias para la expresión de la nitrogenasa.

Aún cuando los *Rhizobía* de crecimiento lento se han -- logrado diferenciar fuera de la planta no se sabe cual es el mecanismo o señal que dispara la diferenciación. En otros microorganismos se ha propuesto que el metabolismo nitrogenado -- está directamente relacionado con el control de la diferenciación, así por ejemplo se ha visto que la privación de nitró-

geno induce la diferenciación de algunas células dentro de el filamento de cianobacterias (*Anabaena azollae*)formandose heteroquistes capaces de fijar nitrógeno (31). El nitrógeno fijado es asimilado en los heteroquistes formando glutamina, la cual es exportada a las células vecinas al heteroquiste (32). Por otra parte se ha observado que si se agrega metionina sulfoximina, que es un inhibidor de la glutamino sintetasa, se induce la formación de heteroquistes en condiciones donde la diferenciación está reprimida y este efecto es revertido si se agrega glutamina. Las evidencias sugieren que la señal que determina cuales son las células en el filamento de *Anabaena* que se deben diferenciar a heteroquistes, es un gradiente de una substancia relacionada con la glutamina (31).

4.- ASIMILACION DE AMONIO.

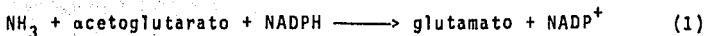
a) Vías de asimilación de amonio en microorganismos.

El nitrógeno es un elemento esencial en los compuestos celulares. El estudio del metabolismo nitrogenado comprende de todos los procesos biológicos en los que participa este elemento: la búsqueda, la incorporación, la distribución, el almacenamiento y la degradación. De todos estos procesos la asimilación de amonio es el punto regulador del metabolismo nitrogenado, ya que es el punto donde converge la incorporación del nitrógeno inorgánico en moléculas orgánicas (gluta--

mato y glutamina) y donde diverge la distribución del nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y piridinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas. Además la asimilación de amonio podría ser un punto de regulación del metabolismo general, ya -- que es aquí donde convergen el metabolismo de carbono y el metabolismo nitrogenado. De tal manera que durante la asimilación del amonio la célula puede integrar señales provenientes del flujo de carbono y del nitrógeno, por ejemplo el α -cetoglutarato funciona como regulador positivo y la glutamina como regulador negativo de la glutamino sintetasa de bacterias gram negativas.

Existen dos vías por las cuales se asimila el amonio en diferentes microorganismos (33). Así en el caso de *Klebsiella pneumoniae* se ha demostrado que:

1.- En condiciones de exceso de amonio, la glutamato - deshidrogenasa (GDH), cataliza la aminación reductiva del ácido α -cetoglutarico, dando como producto la formación del ácido glutámico:



2.- En condiciones donde el amonio se encuentra en bajas concentraciones, por ejemplo durante la fijación de nitrógeno atmosférico, opera una vía alternativa, donde mediante la acción catalizadora de dos enzimas se forma glutamato, con un

gasto neto de un ATP más que en la vía antes mencionada. Estas dos enzimas son la glutamino sintetasa y la glutamato sintasa.

La formación de glutamina se hace a partir del ácido α -glutámico y del amonio a través de la acción de la glutamino α -sintetasa (GS):



A su vez la glutamato sintasa (GOGAT) transfiere el grupo amido de la glutamina al ácido acetoglutárico, formando dos moléculas de ácido glutámico, lo que resulta en la síntesis neta α de una molécula de glutamato:



Debido a que la glutamino sintetasa tiene mayor afinidad por amonio que la GDH, se ha propuesto la existencia de dos vías excluyentes para la asimilación de amonio en *Klebsiella pneumoniae* que operan dependiendo de la concentración de α -amonio (34).

Mediante el estudio de la asimilación de amonio en α otros microorganismos se vió que esta proposición no es general, ya que diferentes microorganismos presentan diferentes maneras de regular estas enzimas, y existen microorganismos que carecen de algunas de las enzimas reportadas en *K. pneumoniae* para la asimilación de amonio.

En *Escherichia coli* la actividad de GOGAT se encuentra

en condiciones de exceso de amonio y esta actividad bajo en condiciones de limitación de amonio; la actividad de GDH está presente en limitación de amonio y aumenta conforme aumenta la concentración de amonio en el medio (35).

Otros microorganismos como *Erwina carotova*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* (34 - 36) carecen de actividad de GDH por lo que solo asimilan amonio por la vía GS-GOGAT.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado dos actividades de GDH (34), una biosintética dependiente de NADPH, cuya actividad varía directamente proporcional a la cantidad de amonio disponible y una GDH catabólica dependiente de NADH cuya regulación es inversa a la GDH biosintética y cuya función es dar amonio a partir de glutamato (37). La actividad de GS en levaduras aumenta conforme se limita de amonio el cultivo y la actividad de GOGAT se encuentra en niveles bajos constitutivos tanto en exceso como en limitado de amonio, por lo que se propone que la vía de asimilación de amonio en *S. cerevisiae* en la vía GDH-GS y se desconoce el papel que juega la GOGAT (38).

El hongo *Neurospora crassa* presenta también dos actividades de GDH, biosintética y catabólica (39). En condiciones de limitación de amonio aunque no disminuye la GDH biosintética si aumenta la actividad de GOGAT (40). Se ha reportado que en *N. crassa* existen dos isozimas de la glutamino sintetasa --

(41, 42, 43, 44, 45), la GS β compuesta de monómeros β , estructurada en octámeros, se expresa principalmente en cultivos creciendo en exceso de amonio y la GS α compuesta de monómeros α , estructurada en tetrámeros, se encuentra fundamentalmente en limitación de amonio. Se ha demostrado que la actividad de la GDH biosintética es lo suficientemente elevada para participar de manera importante en la síntesis de glutamato en condiciones de limitación de amonio (46). Debido a que la actividad de GOGAT se encuentra más elevada en condiciones de limitación de amonio, se ha propuesto que su participación permite que la glutamina pueda ser reciclada a glutamato, facilitando así que se mantengan pozas elevadas de glutamato y bajas de glutamina. Esto favorece que el amonio se asimile en glutamina mediante la acción de la GS α .

b) Asimilación de amonio en *Rhizobium*.

Debido a que todos los *Rhizobium* tienen actividad de GOGAT y no todos de GDH, se ha propuesto que la asimilación de amonio cuando crece en vida libre, procede mediante la participación de la GOGAT y las dos glutamino sintetasas descritas en *Rhizobium* (GSI y GSII, ver más adelante). Las actividades de estas 3 enzimas se han encontrado en todas las especies de *Rhizobium*, a excepción de *Rhizobium sesbania* en donde se ha encontrado que solo tiene actividad de GSI y que carece de la actividad de GSII (47).

La participación de la GDH en la asimilación de amonio en *Rhizobium* no ha sido bien documentada; en algunas especies de *Rhizobium* como *R. cowpea*, *R. meliloti*, no se detecta actividad de esta enzima (48), mientras que en otras como *R. japonicum*, *R. leguminosarum* y *R. trifolii* si se ha logrado detectar sin actividad, pero como es dependiente del cofactor NADH y no esta regulada negativamente por glutamato, se le ha asignado un papel catabólico (49, 13). En *R. leguminosarum* y en *R. trifolii* se ha encontrado una actividad de GDH biosintética dependiente de NADPH, que aumenta en condiciones de limitación de glucosa (13). Es importante mencionar que se han aislado mutantes auxótrofos de glutamato, que no asimilan amonio en *R. leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. cowpea*, *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. sesbania* y que son deficientes en la actividad de GOGAT sin tener afectada su GDH (50, 44, 51). Este dato apoya que la vía de asimilación de amonio en *Rhizobium* es la vía GS-GOGAT, ya que si la GDH y la GOGAT participaran en la síntesis de glutamato, mutantes auxótrofos de glutamato deberían tener alteradas las dos actividades.

c) Actividades de GS en *Rhizobium*.

Las especies de *Rhizobium* tienen dos glutamino sintetas las cuales tienen diferentes propiedades físicas y catalíticas (51). La GSI es muy parecida a la GS de *E. coli* tienen un peso molecular de 59,000 daltones, una estructura oligomé-

rica formada de 12 subunidades, estructuradas en dos capas hexagonales, es resistente al calor y está sujeta a regulación por adenilación.

La regulación por el sistema de adenilación está muy estudiada en *E. coli*, este sistema permite una respuesta rápida a cambios en el medio ambiente; consistente en la inactivación de la GS, mediante la unión covalente de grupos adenilo a un residuo de tirosina específico en cada una de las doce subunidades de la glutamino sintetasa (53). La adenilación se dispara en la siguiente manera:

La adeniltransferasa es la enzima que adenila y desadenila las subunidades de la glutamino sintetasa. La actividad de esta proteína está regulada por la proteína PII, la cual también tiene dos estados, el estado uridilado y el no uridilado, dependiendo en que estado se encuentre la proteína PII induce a la adeniltransferasa a adenilar o desadenilar a la glutamino sintetasa. La uridiltransferasa es la enzima que uridila a la proteína PII cuando las concentraciones de acetoglutarato y ATP se encuentran altas y la concentración de glutamina se encuentra baja. De esta manera la proteína PII uridilada induce a la adeniltransferasa a desadenilar a la GS dejandola en su forma activa, para que esta pueda sintetizar glutamina (Fig. 4) (53).

Este sistema permite un reajuste rápido de la activi-

dad de la GS cuando cambian las condiciones intracelulares de acetoglutarato glutamina y ATP. Así para estudiar la cinética del sistema de adenilación en *E. coli* se ha visto que en un cultivo creciendo en prolina como fuente de nitrógeno, la GS se encuentra en forma activa y todo el amonio proveniente del catabolismo de prolina es tomado para la síntesis de glutamina, si a este cultivo se le agrega un exceso de amonio, se produce una gran cantidad de glutamina y se depletan las pozas de ATP. La glutamina acumulada mediante el sistema de cascada -- activa a la adeniltransferasa a adenilar a la GS (inactivarla), lo cual provoca que se pare la síntesis de glutamina y el consumo de ATP. Todo este sistema funciona en unos 60 segundos - después de agregar un exceso de amonio (Fig. 5) (53).

La GSI de *Rhizobium* regula su actividad por este sistema de adenilación, pero presenta poco cambio en cuanto a la regulación a nivel de síntesis, ya que en altas concentraciones de amonio, el nivel de esta enzima disminuye solo un 30% (52).

La GS II tiene un peso molecular de 36,000 daltones y a diferencia de la GSI es termo labil, y no está regulada por el sistema de adenilación. La GS de bacterias gram positivas tampoco se regula por adenilación; sin embargo se han reportado otras formas de inactivación de GS en *Streptomyces cattleya* (54) y en *Rhodospirillum* (55), al agregar un exceso de amonio se inactiva sus glutamino sintetetasas y se sugieren que la - -

inactivación de estas enzimas se lleva a cabo mediante algún mecanismo que responde a las concentraciones intracelulares de glutamina, en combinación con los estados de oxido/reducción y/o cambios energéticos de la célula que se den al agregar un exceso de amonio.

Se sabe que la GSII de *Rhizobium* presenta una respuesta muy amplia en su síntesis como resultado de cambios de la concentración de amonio en el medio ambiente (52) así en altas concentraciones de amonio esta enzima disminuye hasta casi desaparecer. En condiciones de fijación de nitrógeno y en bajas tensiones de oxígeno también desaparece (52).

Las dos GSs se encuentran presentes cuando *Rhizobium* crece en vida libre, pero no se sabe cual es el papel de cada una de la asimilación de amonio.

Existen varias hipótesis para explicar el papel de las dos glutamino sintetetasas:

1.- R.A. Darrow (52) propone que las dos glutamino sintetetasas están relacionadas con los dos tipos de vida de *Rhizobium* (bacteria-bacteroide). Este autor propone que en enterobacterias la molécula de GS tiene funciones catalíticas y regulatorias y que en *Rhizobium* estas funciones se encuentran separadas en la GSI y la GSII. Así la GSI aunque en condiciones de fijación de nitrógeno se encuentra adenilada (catalíticamente inactiva) mantiene la capacidad de mantener a la

nitrogenasa en su estado dereprimido, Mientras tanto la GSII desaparece en condiciones de fijación de nitrógeno, asegurando que el nitrógeno fijado no sea asimilado por el bacteroide. En vida libre la GSII es la que se encarga de asimilar el amonio en el medio ambiente, mediante algún mecanismo regulatorio diferente al que maneja a la nitrogenasa.

Esta proposición para ser aceptada tiene que ser modificada como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la GS no participa directamente en la regulación de la expresión de la nitrogenasa, sino que ambas proteínas se encuentran bajo una regulación común, a través de la producción de las proteínas regulatorias de los sistemas Ntr, codificadas por los genes gln G, gln L y gln F (21).

2.- R. Ludwig (27) propone que la función de la GSII es sintetizar glutamina como sustrato para la síntesis de purinas y que la GSI asimila la mayor parte del amonio para proporcionar la glutamina que la célula requiere para crecer en vida libre.

3.- Por último es posible que tanto la GSI como la GSII sean enzimas catalíticamente activas cuya regulación alostérica se lleva a cabo de manera complementaria. Esto se ha demostrado para los dos glutamino sintetasas de *Bacillus caldolyticus* en base a sus diferentes respuestas a retroinhibidores derivados de la glutamina, donde cada metabolito capaz de

regular a la GS, inhibe solo una fracción de una de las actividades de la GS (56).

OBJETIVOS.

Rhizobium es un microorganismo que presenta dos tipos de vida y dos maneras de manejar el nitrógeno; así cuando crece en vida libre, puede asimilar el nitrógeno de diferentes -- fuentes e incorporarlo en moléculas orgánicas. No se ha definido con precisión cual es la vía por la cual se asimila el amonio, ni el papel fisiológico de las dos glutamino sintetasas, durante el crecimiento de vida libre. Mientras que cuando entra en contacto con la planta, se diferencia a bacteroide, que deja de crecer, pierde la capacidad para asimilar amonio y reduce nitrógeno atmosférico excretándolo en forma de amonio hacia el citosol de la célula vegetal.

Debe existir una coordinación regulatoria entre la fijación de nitrógeno y el metabolismo nitrogenado de *Rhizobium*, es factible pensar que las señales metabólicas que inducen o reprimen a la fijación de nitrógeno, estén en directa relación con las señales que cierran o abren la asimilación de amonio.

En el caso de *Anabaena*, al igual que *Rhizobium*, tiene que diferenciarse para expresar su nitrogenasa, formándose un organismo especializado en la fijación de nitrógeno (31). Como ya se mencionó el metabolismo nitrogenado está directamente relacionado con la diferenciación en *Anabaena*, ya que la privación de nitrógeno induce la diferenciación (31). Posiblemente

en *Rhizobium* el metabolismo nitrogenado también esté en relación directa con la diferenciación.

En *Rhizobium sesbania* se ha reportado que la glutamina y el amonio afectan la inducción de la nirogenasa, (47) además mutantes afectadas en la asimilación de amonio (NADPH-GOGAT⁻ ó GSI⁻) son incapaces de inducir su nitrogenasa. Por otro lado se afecta la inducción de la nitrogenasa al bloquear la asimilación de amonio utilizando inhibidores de las enzimas que participan en este proceso (47).

En este proyecto se utilizó *Rhizobium phaseoli* como modelo para estudiar las diferentes estrategias que tiene un *Rhizobium* de crecimiento rápido para manejar el nitrógeno tanto en vida libre como durante la simbiosis. Para esto tratamos de responder las siguientes preguntas sobre el metabolismo nitrogenado de esta especie de *Rhizobium*.

1.- ¿Cuáles son las enzimas que participan en la asimilación de amonio cuando crece en vida libre?

a) ¿Cuál es el papel fisiológico de las actividades de la GDH y de la GOGAT en la síntesis de glutamato?

b) ¿En qué condiciones participan cada una de las glutamino sintetetasas?

c) ¿Cuál es el papel fisiológico de las dos glutamino sintetetasas en la asimilación de amonio?

d) ¿Existe algún sistema de inactivación de la GSII por amonio similar a la adenilación de la GSI?

2.- ¿Es capaz *Rhizobium phaseoli* de diferenciarse en vida libre?

a) ¿Qué relación existe entre, la utilización del nitrógeno del medio, su conversión a amonio, su posible excreción, y la viabilidad de las células? utilizando estos criterios - - como indicadores de diferenciación a bacteroide.

MATERIALES Y METODOS:

1.- CEPAS: Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 1

2.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

Todos los crecimientos se iniciaron inoculando medios mínimos a 0.05 de D.O. a 540 nm, con células precrecidas 24h. en medio rico PY, (extracto de levadura 3%, peptona de caseína 5% y CaCl_2 7mM).

Los crecimientos se hicieron en medio mínimo Y, ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08 mM, MgSO_4 0.83 mM, K_2HPO_4 1.23 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM) con diferentes fuentes de carbono como succinato 10 mM o glucosa 0.2% y diferentes fuentes de nitrógeno como glutamato de Na 10 mM, glutamina 10 mM, NH_4Cl 10 mM, KNO_3 10 mM, arginina 10 mM, histidina 10 mM y prolina 10 mM. Para los cultivos limitados alimentados de amonio se utilizó un flujo de 0.003 micromolas por ml por h.

La temperatura de crecimiento fue de 30°C y los cultivos líquidos se agitaron a una velocidad de 200rpm.

El crecimiento se siguió midiendo la D.O. a 540 nm y la proteína celular se determinó por el método de Lowry (58).

3.- DETERMINACIONES ENZIMATICAS:

Los cultivos se concentraron 100 veces, mediante centri

fugación a 3,000 rpm. durante 10 min, a 4°C, se lavaron las -- células con la solución amortiguadora de extracción corespon-- diente y luego se sonificaron 5 veces por 30 seg. o bien se rom-- pieron en un desintegrador Braun dando 5 pulsos de 1.30 min. -- utilizando perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro, en una pro-- porción de un volúmen de perlas por 3 volúmenes de células.

Después de romper las células, los extractos se centri-- fugaron durante 10 min. a 10,000 rpm. El sobrenadante fué usado para las determinaciones enzimáticas.

Se probarón los siguientes amortiguadores para la extrac-- ción de la GOGAT y GDH:

- 1.- KCl 0.1 M, ditioneitol 0.1 mM, pH 7.6
- 2.- Hepes 0.05 M, pH 7.5
- 3.- KH_2PO_4 0.1 M, 0.5% mercaptoetanol, pH 7.6
- 4.- NaH_2PO_4 0.08 M, pH 7.5
- 5.- KH_2PO_4 0.1 M pH 7.5
- 6.- KH_2PO_4 0.1 M, EDTA 0.001 M, mercaptoetanol 0.001 N, pH 7.0

Para los ensayos de las actividades de estas enzimas se probaron los siguientes amortiguadores:

- 1.- Hepes 0.1 M, mercaptoetanol 1%, pH 8.5
- 2.- KH_2PO_4 0.1 M, pH 7.8
- 3.- Tris 0.05 M, pH 7.5

Se estableció que las condiciones óptimas para medir la

activación de GOGAT son: Solución de extracción, KCL 0.1 M, mercaptoetanol 0.5% pH 7.6 Amortiguador de ensayo, Hepes 0.1M, mercaptoetanol 1%, pH 8.5 Substratos en un ml. α -cetoglutarato 2 mM, pH 7.0, glutamina 3.65 mM, NADPH 0.1 mM.

La reacción de la actividad de GOGAT se determinó siguiendo la oxidación de la coenzima NADPH espectrofotométricamente a 340 nm. Se estableció la linealidad de la reacción, se comprobó la dependencia de la actividad por sus substratos (α -cetoglutarato y glutamina) y la inhibición de la actividad al añadir al ensayo azaserina, un inhibidor específico de las transaminasas.

Para determinar la actividad de la GDH, también se hicieron curvas con diferentes concentraciones de substratos y pHs, en ninguna condición se logró detectar actividad de GDH.

La actividad de la glutamino sintetasa se midió por el ensayo de transferasa: La mezcla de reacción contenía en 0.5ml: imidazol 0.168 M, pH 7.0, hidroxilamina 0.022 M, $MnCl_2$ 0.33 mM, arsenato de K 0.031 M y ADP 0.0449 M; la reacción se arrancó con 0.02 M de glutamina y se paró con un ml de una solución de $FeCl_3$, 0.2 M, TCA 0.12 M y HCl 4.59 M.

Para medir la reacción con células enteras se permeabilizó su membrana añadiendo a la solución de ensayo CTAB 1 mg/ml.

Para medir el estado de adenilación de la CsI, se midió la actividad de transferasa agregándole 60 mM de $MgCl_2$ y luego

utilizando la siguiente relación para determinar el estado de adenilación: $\bar{n} = 12 - 12 b/a$, donde \bar{n} puede variar entre 0 y 12 moles de grupos adenilo por moles de enzima activa, a) - corresponde a la actividad total de transferasa de las subunidades desadeniladas y adeniladas de la GS, obtenida midiendo la actividad de transferasa en presencia de $MnCl_2$ y b) corresponde a la actividad de transferasa de las subunidades desadeniladas de la GS, medida en presencia de $MnCl_2$ y de $MgCl_2$.

También se midió la actividad de la glutamino sintetasa por el ensayo de sintetasa. La mezcla de reacción contenía en 0.5 ml: imidazol 0.117 M, hidroxilamina 0.058 M, $MgCl_2$ 0.07M, glutamato 0.2 M; la reacción se arrancó añadiendo ATP 0.023 M y se paró a diferentes tiempos agregando un ml de la solución de $FeCl_3$ 0.2 M, TCA 0.12 M y HCl 4.59 M.

La actividad de sintetasa de la GS también se determinó utilizando glutamato marcado y viendo la aparición de glutamina marcada. La mezcla de reacción contenía en un ml: $MgSO_4$ 80 mM, ATP 15 mM, ND_4Cl 8 mM, glutamato 20 mM + 500,000 cpm H^3 glu, imidazol 50 mM y EDTA 0.5 mM. Después de parar la reacción con etanol al 80%, se separó la glutamina formada, mediante la absorción del glutamato a una columna de un ml de Dowex 1X8, la glutamina eluida se contó en un contador de sentelleo marca Beckman.

Una unidad de actividad específica corresponde a una micromola de producto formado ó coenzima reducida por mg. de proteína.

Para separar las dos actividades de GS, se utilizaron varios procedimientos:

1.- Por sus propiedades iónicas. Se utilizó una columna de DEAE-celulosa de 10 ml, equilibrada con solución amortiguadora de extracción de la glutamino sintetasa (imidazol 0.01 M, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7.0) y se pasó un gradiente lineal al KCl (de 0 a 0.6 M) para eluir las muestras (43).

2.- Por su afinidad a sefarosa-antranílico. Se utilizó una columna de dos ml, equilibrada con solución amortiguadora de extracción (imidazol 0.01 M, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7.0) y eluyendo con AMP 40 mM, pH 7.0.

3.- Por su peso molecular. SE utilizó un gradiente de sacarosa del 5 al 20% en solución amortiguadora de extracción, centrifugando 3 h. a 40,000 rpm (52).

4.- Por su termoestabilidad. Se midió la actividad antes y después de calentar el extracto 1h. a 50°C para inactivar a la GSII (52).

4.- DETERMINACION DE AMONIO.

Para determinar la poza intracelular de amonio, se centrifugaron 20 ml de cultivo, se resuspendió la pastilla en - - $HClO_4$ 0.25 M y después de centrifugar a 3,000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos al sobrenadante se le agregó un ml de KH_2PO_4 1 M,

pH 7.6. El $KClO_4$ precipitado se centrifugó a 3,000 rpm, durante 10 minutos y la cantidad de amonio en el sobrenadante fué determinada midiendo la velocidad inicial de la reacción de GDH bovina comercial marca sigma. La mezcla de reacción contenía en un ml, α -cetoglutarato 20mM y NADH 0.1 M en solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7.6. Para 0.5 ml de muestra problema se usó 0.5 ml de solución de la GDH bovina al 0.1% - - conteniendo también los sustratos mencionados. La reacción se midió siguiendo la oxidación del NADH espectrofotométricamente. La velocidad inicial de la reacción es directamente proporcional a la concentración intracelular de amonio.

Para determinar el amonio extracelular se centrifugaron 10 ml de cultivo y se desechó el precipitado celular; al medio sin células se le agregó 0.1 ml de NaOH 10 M y se midió el amonio con un electrodo Orion (Cambridge, Mass. USA) con una membrana específica para este compuesto.

RESULTADOS.

1.- DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO DE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACION DE AMONIO.

Con objeto de establecer las condiciones óptimas para el ensayo de las enzimas GOGAT y GDH, se hicieron extractos sonificados con seis diferentes amortiguadores de extracción, ya que las enzimas pueden ser más solubles o estables en algunas soluciones de sales que en otras. Se probaron las soluciones -- amortiguadoras de extracción descritas en materiales y métodos.

A estos extractos se les midió actividad de GOGAT y de GDH con tres diferentes soluciones amortiguadoras de ensayo. Se utilizaron los dos cofactores NADH y NADPH para seguir la reacción por el cambio de absorbencia a D.O. de 340 nm. De esta manera se determinó cuales eran las mejores soluciones amortiguadoras para la extracción y para el ensayo. Se encontró que para medir la actividad de GOGAT, la mejor manera de extraer la enzima es utilizar una solución de KCl 0.1 M, mercaptoetanol 0.5%, pH 7.6 y la mejor solución amortiguadora para el ensayo es Hepes 0.1 M, mercaptoetanol 1%, pH 8.5.

Para determinar las condiciones óptimas de los substratos para las enzimas mencionadas, se hicieron curvas de actividad con diferentes concentraciones de cada uno de los substra-

tos a diferentes pHs. De esta manera se determinó que las condiciones óptimas de los sustratos para medir la actividad de GOGAT son: α -cetoglutarato 2 mM, glutamina 3.65 mM, NADPH 0.1 mM, pH 8.5. El NADH no funciona como cofactor de esta actividad.

No se detectó actividad de GDH en ninguno de los dos cofactores usados (NADH ó NADPH), aún cuando los extractos se concentraron 200 veces. De estos datos concluimos que la asimilación de amonio en *Rhizobium phaseoli* procede únicamente por la vía GS-GOGAT, teniendo así un solo punto para su asimilación.

Para determinar las condiciones de ensayo de las dos glutamino sintetasas, se separaron estas dos actividades por sus propiedades iónicas, en una columna de DEAE-celulosa y a los dos picos de actividad que se obtuvieron se les hicieron curvas de pH y de concentración de sustratos. En la figura 6 se muestran las curvas de las actividades de las dos GSs a diferentes pHs, en la cual se ve que el pH óptimo para medir la actividad de transferasa de la GSII es de 7.8 y para medir la actividad de la GSI es de 7.3.

El pH óptimo para medir la actividad de la GSI separada en la columna de DEAE-celulosa se encuentra sesgado hacia un pH de 7.8, esto se debe a que esta fracción se encuentra muy contaminada de actividad de GSII. Pero utilizando un extracto

donde la GSII fué inactivada por calor, se puede ver que el pH óptimo para medir la actividad de la GSI es de 7,3.

También se separaron por su diferente afinidad a una columna de sefarosa-antranílico. Se obtuvieron dos fracciones, una que tuvo afinidad por la columna de antranílico y otra que no. Para identificar cual de las dos glutamino sintetetas tuvo afinidad por la columna, se separaron en un gradiente de sacarosa por su diferente peso molecular, identificandose a la GSI como la enzima que tiene afinidad por la columna de sefarosa-antranílico (Fig. 7).

Debido a que la GSII es termolabil (52) otra forma de distinguir las dos actividades en un extracto celular, es a través de medir la actividad al extracto crudo antes y después de calentar a 50°C. Se confirmó que al calentar el extracto se inactiva la actividad de la GSII y que la actividad de la GSI no es afectada (Fig. 8).

2.- REGULACION DE LAS ENZIMAS DE ASIMILACION DE AMONIO EN *Rhizobium phaseoli* CRECIENDO EN VIDA LIBRE.

Sabiendo que la actividad de GDH no es detectable en *Rhizobium phaseoli* y que la asimilación de amonio procede por la vía GS-GOGAT, se estudió la regulación metabólica de estas enzimas durante el crecimiento en vida libre, usando diferentes fuentes de nitrógeno.

a) REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE GOGAT EN DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO.

Cuanto a la regulación de la actividad de GOGAT, encontramos que esta enzima tiene actividades altas en todas las fuentes de nitrógeno utilizadas (glutamina, NH_4Cl , KNO_3) excepto en glutamato, que es el producto de la actividad de esta enzima (Fig. 9). Podemos concluir que aunque baja la actividad de GOGAT se requiere en NH_4Cl , KNO_3 y glutamina para sintetizar glutamato y que solamente en presencia de un exceso de glutamato en el medio se reprime la síntesis de esta enzima.

b) REGULACION DE LAS ACTIVIDADES DE LAS DOS GSs EN LAS DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO.

El estudio de las actividades de las dos glutamino sintetetasas en las diferentes condiciones de crecimiento, es una forma de obtener información sobre la función de cada una de estas actividades.

Midiendo la actividad de las dos GSs por el ensayo de sintetasa a lo largo del crecimiento, encontramos que las dos glutamino sintetetasas se regulan de manera coordinada y complementaria en diferentes fuentes de nitrógeno. Que se regulen coordinadamente significa que la actividad de la GSI se induce solo en algunas fuentes de nitrógeno y que la actividad de la GSII se induce en otras fuentes de nitrógeno. Que se regulen

complementariamente significa que la actividad de una GS disminuye al aumentar la actividad de la otra GS. Así la GSI se induce en medio rico y también cuando las células se crecen en condiciones de limitación de amonio, mientras que la GSII se encuentra ausente en estas condiciones y solo se induce en cultivos de medio mínimo suplementados con una sola fuente de nitrógeno, donde disminuye la actividad de la GSI (Fig. 10).

Cuando las células se transfieren de medio rico a medio mínimo con cualquiera de las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas, la GSI que se encontraba activa en medio rico, se inactiva por el sistema de adenilación. Se ha observado que los niveles de la GSI no varían durante el crecimiento, ya que midiendo la actividad de la GSI por el ensayo de transferasa en presencia de Mn^{+2} (correspondiente a las actividades de las subunidades adeniladas y desadeniladas) esta actividad permanece constante durante todo el crecimiento (Fig. 11). Sin embargo el grado de adenilación de la GSI aumenta conforme el cultivo crece, de tal manera que solo se encuentra GSI catalíticamente activa durante las primeras horas del crecimiento. Además la activación de la GSI, medida por el ensayo de síntesis durante el crecimiento demuestra que la GSI disminuye conforme el cultivo crece (Fig. 12).

De estos datos se puede concluir que la regulación de la GSI se da a nivel de inactivación de la actividad y no a nivel de la síntesis de la enzima. También se puede concluir

que la inactivación de la GSI observada al transferir las células de medio rico a medio mínimo, es independiente de la fuente de nitrógeno utilizada, ya que la GSI se inactiva durante las primeras horas del crecimiento con cualquiera de las fuentes de nitrógeno utilizadas (NH_4Cl , KNO_3 , glu, gln, arg) (Fig. 12).

Una posible explicación del comportamiento de la GSI al ser transferido de medio rico a medio mínimo, podría ser que la GSI responda a cambios en las concentraciones de cationes divalentes como Mg^{+2} ó Mn^{+2} , ya que en diferentes condiciones de cultivo debe haber diferente asequibilidad de cationes. Se ha visto que ciertos cationes divalentes están relacionados con la estabilización de la estructura y la activación de la GS de *E. coli* (53), y que existen cambios conformacionales en la estructura de esta proteína cuando bajan las concentraciones de Mn^{+2} (53). F. Wedler (59) ha hecho estudios de las cinéticas de la activación de la glutamino sintetasa por Mg^{+2} y por Mn^{+2} , encontrando que la GS es una enzima que usa preferentemente Mn^{+2} . De esta manera los metales divalentes podrían tener una función regulatoria en la activación de la GSI.

Otra explicación del comportamiento de la GSI en medio mínimo, podría ser que esta enzima responda de diferente manera a cambios en el pH intracelular que se den al cambiar de

medio ó a lo largo del crecimiento. La GSI tiene un pH óptimo mas ácido que el pH óptimo para la activación de la GSII.

La respuesta de la actividad de la GSI a diferentes pHs podría estar ligada a la disponibilidad de los cationes divalentes en el medio, ya que en *E. coli* se ha visto que existen diferentes pHs óptimos dependiendo de que la enzima esté unida a Mg^{+2} o a Mn^{+2} , así el pH óptimo cuando la enzima se une a Mn^{+2} es de 7.5, mientras que el pH óptimo cuando se une a Mg^{+2} es de 5.0 (59).

La actividad de la GSI se induce en condiciones de limitación de amonio. El hecho de que la GSI se induzca en esta condición y no la GSII, no se debe a que la GSI tenga una afinidad diferente por el amonio, ya que Darrow ha reportado que la K_m por amonio de las dos GSs es muy similar (52).

El dato mas desconcertante en la regulación de la GSI es la inducción de esta actividad en condiciones totalmente extremas, es decir en medio rico y en crecimiento en medio mínimo limitados de amonio. Es posible que el inductor de la GSI sea algún metabolito común en estas dos condiciones de crecimiento. En *E. coli* se sabe que en condiciones de limitación de amonio, el α -cetoglutarato acumulado activa la desadenilación de la GS, dejandola en su forma activa (53). Una posible explicación sería que la GSI sea una enzima que responda a las concentraciones intracelulares de α -cetoglutarato y que en medio

limitado de amonio o en medio rico (peptona, extracto de levadura) la concentración de este metabolito sea muy elevada, a diferencia del medio mínimo donde la concentración de α -cetoglutarato seguramente es baja.

La actividad de la GSI en medio rico podría participar en la resistencia de glutamina, ya que se ha encontrado que algunos microorganismos tienen un recambio muy grande de este aminoácido (60).

La actividad de la GSII se encuentra ausente en medio rico, y se induce cuando las células se transfieren a medio mínimo suplementado con una sola fuente de nitrógeno. La actividad de esta enzima aumenta conforme el cultivo crece y cuando el cultivo deja de crecer, disminuye hasta desaparecer, como se observa en la figura 18. La inducción de la actividad de la GSII observada en las diferentes fuentes de nitrógeno, dependen de la fuente de nitrógeno utilizada; así la inducción de la actividad de la GSII es mayor en glutamato, arginina o nitrato y mucho menor en amonio y en glutamina (Fig. 12). La regulación de la GSII en las diferentes fuentes de nitrógeno es independiente de la fuente de carbono utilizada, ya que se observa la misma inducción cuando se usa glucosa o succinato como fuentes de carbono. La GSII es por lo tanto una enzima que puede censar la disponibilidad del nitrógeno en el medio ambiente, por lo que pensamos que esta enzima participa de manera fundamental en la síntesis de glutamina en medio mínimo.

Para probar la importancia de la GSII en el crecimiento en medio mínimo, se utilizó la cepa CFN2012 (Tabla 1), esta es una mutante cromosomal por la inserción del transposon In5 que fue seleccionada por su sensibilidad a metionina sulfoximina, - un inhibidor de la glutamino sintetasa (61) se encontró que -- esta mutante tiene una GSII alterada, que presenta las siguientes características:

- 1.- No presenta actividad de GSII medida por el ensayo de transferasa (Fig. 13A).
- 2.- Presenta una actividad de sintetasa que es mas sensible a - la temperatura (Tabla 2).
- 3.- Para detectar actividad de sintetasa es necesario utilizar concentraciones muy elevadas de glutamato, lo cual sugiere que tiene afectada su Km por glutamato (Fig. 13B).

Como consecuencia de estas alteraciones en la GSII, la mutante CFN2012 crece en medio mínimo con amonio, con un tiempo de duplicación de seis horas, a diferencia de la cepa silvestre que crece con un tiempo de duplicación de cuatro horas (Fig. - 14). Este dato indica que el funcionamiento de la actividad de la GSII es importante para la asimilación de amonio en medio mínimo.

Debido ha que se ha encontrado que existe cierta heterogeneidad entre diferentes cepas de *Rhizobium phaseoli*, en relación a sus perfiles de proteínas así como a la organiza-

ción de la importancia genética contenida en los plásmidos, decidimos probar si la regulación complementaria encontrada en relación a las actividades de las dos glutamino sintetetasas, que se presenta en la cepa silvestre CFN 42, esta presente en otras cepas de *Rhizobium phaseoli*: probamos las cepas 7-20, 899, CFN2012 y 8251 (Tabla 1).

Se observó que la regulación complementaria de las actividades de las dos glutamino sintetetasas, está presente en todas las cepas mencionadas. En la figura 15 se puede observar que la GSI está elevada al crecer en medio rico y que al transferir las células a medio mínimo se inactiva, al mismo tiempo que la GSII se induce. En esta figura se puede ver que la cepa mutante CFN2012 presente actividad de sintetasa de la GSII, -- esto se debe a que los ensayos de actividad de GS se hicieron utilizando una concentración de 200 mM de glutamato.

Se probó también el crecimiento de las cepas CFN42, CFN2012 y 7-20, en condiciones de limitación de amonio, encontrándose que tanto la cepa CFN42 como la cepa CFN2012, inducen la actividad de la GSI y crecen con un tiempo de duplicación de 12 horas (Fig. 16). La cepa 7-20 no induce la actividad de la GSI y crece con un tiempo de duplicación de 18 horas (Fig. 16). Como la cepa 7-20 es una cepa que carece de plásmidos, -- este dato podría sugerir que la presencia de los plásmidos -- tengan alguna relación con la inducción de la actividad de la GSI, aunque hay que considerar que la cepa 7-20 no proviene

de la cepa CFN42. Para probar si los plásmidos contienen alguna información necesaria para la expresión de la GSI en limitado de amonio, es necesario utilizar cepas derivadas de la cepa -- CFN42 que carezcan de algunos de los plásmidos o introducir algunos de los plásmidos de la cepa CFN42 en la cepa 7-20.

3.- INACTIVACION DE LA GSII DE *Rhizobium phaseoli*.

Como se mencionó antes, se sabe que la actividad de la GSI se inactiva mediante el sistema de adenilación (52). En -- cuanto a la GSII no se ha descrito ningún sistema de inactivación, sin embargo el hallazgo de que la mutante CFN2012 tiene una GSII alterada, causada por una inserción Tn5, sugiere la existencia de un sistema que modifica a esta enzima.

Con el objeto de determinar en forma directa la existencia de un sistema de inactivación de la actividad de la GS II, se siguió un procedimiento experimental semejante al que se utilizó para estudiar la cinética de inactivación de la GS de *E. coli* (53). Este consiste en agregar un exceso de amonio (15 mM) a un cultivo creciendo en glutamato como fuente de nitrógeno y observar como disminuye la actividad de la glutamino sintetasa. Encontramos que al agregar un exceso de amonio, se pierde en 20 minutos la actividad de transferasa de la GSII (Fig. 17). En cuanto a la actividad de sintetasa de la GSII, después de agregar el exceso de amonio, encontramos que presenta características semejantes a las que presenta la GSII -

de la mutante CFN2012, como son las siguientes:

1.- Es una actividad más sensible a la temperatura y al igual que la cepa CFN2012 tiene una vida media de 3 min. a 50°C, mientras que la cepa silvestre tiene una vida media de 7 min. - (Tabla 2).

2.- Es una actividad que tiene una Km por glutamato de 100 mM, similar a la de la cepa FN2012 y mucho mayor que la de la cepa silvestre (3.7 mM) (Tabla 2).

De los resultados anteriores se infiere la existencia de una proteína que modifica y/o inactiva a la GSII. Esta proteína se activa en presencia de un exceso de amonio. La inserción del transposon Tn5, en un gene regulador de la cepa CFN2012 sería el responsable de que se exprese constitutivamente la proteína que modifica a la GSII.

Como se mencionó antes, hemos observado que la actividad de la GSII disminuye cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria del crecimiento (Fig. 18). Pensamos que esta bajada en la actividad de la GSII, pudirera deberse a la operación del mismo sistema que se activa al agregar un exceso de amonio; para analizar esto se mezcló una preparación de la GSII pura (purificada por D. Enriquez) con extractos de la cepa CFN2012, de la cepa CFN42 después de agregarle el exceso de amonio y de las células de la cepa CFN42 que alcanzaron la fase estacionaria de el crecimiento.

Estas mezclas de extractos se incubaron 30 min. a 30°C y se midió la actividad de sintetasa utilizando una concentración de 100 mM de glutamato en el ensayo. Se observó que la inactivación de la GSII pura, depende linealmente de la cantidad de proteína agregada de los tres extractos mencionados y que no hay inactivación si se mezcla la GSII pura con un extracto proveniente de un cultivo con la GSII inducida (Fig.19).

Este experimento demuestra claramente que existe un componente en el extracto de las células que alcanzaron la fase estacionaria, que inactiva a la GSII pura, con características similares al componente presente en los extractos de la cepa CFN2012 y de las células a las que se les agregó el exceso de amonio. Seguramente la disminución en la actividad de la GSII que se observa cuando empieza la fase estacionaria se debe al funcionamiento del sistema de inactivación de la GSII.

En la figura 18, se observa que la pérdida de la actividad de la GSII a partir del inicio de la fase estacionaria, se realiza en un tiempo de 8 h. Este lapso es mayor al observado cuando la GSII se pierde al agregar el exceso de amonio (20 min); creemos que la diferencia es que esta actividad fue medida utilizando una concentración de glutamato de 200 mM, en el ensayo que es una concentración de saturación para la GSII inactivada, por lo que si se midiera la actividad de la GS en la fase estacionaria con una concentración baja de glutamato la cinética de inactivación sería semejante a la que se observa

cuando se inactiva con un exceso de amonio.

Hasta el momento no sabemos en que consiste la modificación de la GSII, podría ser una metilación, fosforilación, acetilación, degradación, etc. estudios con compuestos marcados y con anticuerpos anti-GSII, permitirán conocer la naturaleza de la alteración de esta enzima.

Se sabe que los bacteroides no presentan actividad de ninguna de las dos GSs. Este sistema de inactivación de la GSII podría funcionar para inactivar a la GSII de las bacterias que proliferan en el hilo infectivo, de tal manera que cuando se diferencian a bacteroide, la actividad de la GSII se encuentre inactivada, y el amonio producido por la nitrogenada no sea asimilado. Se pretende aislar una cepa mutante que carezca de este sistema de inactivación para estudiar sus efectos en la infección, la diferenciación y la fijación de nitrógeno efectuada por *Rhizobium*.

4.- CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS QUE HAN ALCANZADO LA FASE ESTACIONARIA DEL CRECIMIENTO.

En un estudio colateral hemos encontrado evidencias que indican que existe cierta semejanza entre las bacterias que han alcanzado la fase estacionaria creciendo en un medio mínimo suplementado con un sola fuente de nitrógeno y el estado de bacteroide.

Entre las características del bacteroide se encuentran las siguientes:

- 1.- Los bacteroides son capaces de fijar nitrógeno atmosférico
- 2.- Sus dos glutamino sintetetasas se encuentran inactivadas
- 3.- El amonio fijado es excretado al citosol de la planta, donde es asimilado por las enzimas codificadas por la célula vegetal.
- 4.- Los bacteroides pierden la viabilidad.

Hemos observado que algunas de estas características, son compartidas con la célula que han alcanzado la fase estacionaria del crecimiento, por lo que proponemos que estas bacterias creciendo en vida libre han cambiado su estrategia para manejar nitrógeno a una que es similar a la utilizada por los bacteroides.

a) Inactivación de la glutamino sintetetasas.- Es la fase estacionaria de un cultivo crecido en medio mínimo con un sola fuente de carbono y de nitrógeno no hay actividad de ninguna de las dos GSs, mientras cuando las bacterias alcanzan la fase estacionaria después de crecer en medio rico, conservan la actividad de la GSI (Fig. 18).

b) Excreción de amonio al medio.- Hemos observado que cuando *Rhizobium phaseoli* alcanza la fase estacionaria, es capaz de excretar amonio al medio, para esto se requiere que el amino

ácido utilizado como fuente de nitrógeno contenga más de un átomo de nitrógeno por molécula (gln, arg, his) Fig. 20).

La excreción de amonio empieza cuando el cultivo deja de crecer, esto se correlaciona con el inicio de la inactivación de la GSII y con la depleción de las pozas intracelulares de amonio (Fig. 21). Este experimento podría sugerir que el sistema de transporte de amonio al exterior de la célula, es un sistema activo de gran afinidad, sin embargo M.J. Dilworth encontró que en *Rhizobium leguminosarum* la poza intracelular de amonio se equilibra muy rápidamente con la poza extracelular y que el amonio intracelular puede llegar a estar muy elevado en la fase estacionaria (64); si esto sucediera en *R. phaseoli* no lo detectaríamos pues el procedimiento que utilizamos para medir el amonio intracelular, se lavan las células dos veces con medio sin amonio.

Podemos decir que *Rhizobium* es un microorganismo que tiene la capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno para su crecimiento; y que cuando deja de crecer no reprime el catabolismo y la utilización de ciertos aminoácidos, sino que sigue teniendo la capacidad de extraerles el amonio, este por no poder asimilarse por las dos GSs es excretado al medio. Esta característica de *Rhizobium* podría *per se* beneficiar a la planta, pues es una forma de que *Rhizobium* le proporcione a la planta nitrógeno en forma de amonio.

c) Pérdida de la viabilidad.- Cuando un cultivo de - -

Rhizobium creciendo en medio mínimo alcanza la fase estacionaria, se inactivan sus glutamino sintetetasas, por lo que pierde la capacidad para sintetizar glutamina, ahora bien nos preguntamos ¿Si un cultivo de *Rhizobium* en la fase estacionaria se diluye en medio fresco, es capaz de inducir alguna de sus glutamino sintetetasas y volver a crecer? ¿Es reversible este proceso de inactivación?

Encontramos que las células que han alcanzado la fase estacionaria, después de crecer en un medio mínimo, pierden su viabilidad. Con objeto de determinar desde que momento en el crecimiento en medio mínimo se pierde la capacidad de crecer y dividirse, se siguió el siguiente enfoque experimental:

- 1.- Se utilizaron células precrecidas 24h. en medio rico para inocular un medio mínimo constituido por succinato y NH_4Cl , a densidad óptima de 0.05 a 540 nm.
- 2.- Cada cuatro horas se diluyeron las células en el mismo medio inoculando a una D.O. de 0.05 a 540 nm.
- 3.- Cada cultivo diluido se incubó a 30°C y se determinó la -- proteína y el número de células.

En la figura 22 se muestran las curvas de crecimiento que se obtuvieron, en donde se observa que ha medida que se diluyen las células del cultivo original se sintetizan menos -- proteína, y que el cultivo diluido después de las 24 h, perdió totalmente la capacidad de crecer. En esta misma figura se - -

muestran las curvas de crecimiento obtenidas por número de células, en las cuales claramente se observa que los cultivos que fueron diluidos a las 4, 8 y 12 h. del crecimiento tuvieron una disminución de su capacidad de dividirse, ya que alcanzan solo cuatro duplicaciones, mientras que las células del tiempo cero alcanzan ocho duplicaciones. Este es un dato muy difícil de interpretar, ya que significa que la pérdida de la viabilidad se da en dos pasos. En solo cuatro horas de crecimiento en medio mínimo se disminuye notablemente la capacidad de duplicación y de crecimiento. Se pueden diferenciar tres poblaciones, en cuanto a su capacidad de dividirse:

- 1.- Las células de tiempo cero, que provienen de medio rico y que alcanzaron ocho duplicaciones.
- 2.- Las células diluidas a las 4, 8 y 12 h. de crecimiento en medio mínimo, que alcanzaron cuatro duplicaciones.
- 3.- Las células diluidas a las 24 h. del crecimiento en medio mínimo, las cuales perdieron capacidad de dividirse en ese medio.

Estas tres poblaciones se pueden correlacionar con las actividades de la glutamino sintetasa con las que inician su crecimiento en medio mínimo, así las células del tiempo cero inician su crecimiento con una actividad alta de GSI, mientras que las células diluidas a las 4, 8 y 12 h. inician su crecimiento con la GSI adenilada y con actividad de GSII y por

Último las células diluidas a las 24h. no presentan actividades de la GSI ni de GSII y no crecen.

Para probar si la pérdida de la capacidad de dividirse se puede correlacionar con la inactivación de las dos glutamino sintetasas, se siguió el mismo enfoque experimental descrito, pero transfiriendo las células de medio rico a medio rico. En la figura 23 se muestran las curvas de crecimiento que se obtuvieron y se observa que después de cada dilución todos los cultivos alcanzan el mismo número de células y la misma proteína, inclusive el cultivo que fué diluido después de crecer 24 h. en medio rico. Es interesante señalar que todos los cultivos transferidos de medio rico inician su crecimiento con la GSI inducida.

De estos experimentos, se puede concluir que las células creciendo en medio mínimo, van teniendo cambios paulatinos en cuanto a su capacidad de sintetizar proteína, que resultan en la pérdida total de la capacidad de dividirse en medio mínimo y que esto coincide con la pérdida de la capacidad de sintetizar glutamina.

DISCUSION.

El objetivo de este trabajo fué tratar de entender las diferentes estrategias metabólicas que tiene *Rhizobium* para manejar el nitrógeno en vida libre.

Con el objeto de estudiar como se maneja el nitrógeno en vida libre, se estudio la fisiología y la regulación de las enzimas de asimilación de amonio en diferentes condiciones nitrogenadas. Se encontró que la asimilación de amonio en vida libre procede exclusivamente por la vía GS-GOGAT. La GOGAT juega un papel fundamental en la síntesis de glutamato, debido a que solo se reprime la síntesis de esta enzima cuando existe un exceso de glutamato en el medio (Fig. 9). El aislamiento de un auxótrofo de glutamato puede conducir a encontrar una mutante sin la actividad de GOGAT, tal como se ha reportado para algunas especies de *Rhizobium* (47, 50, 51).

En *Rhizobium phaseoli* existe un solo punto de asimilación de amonio, pero se encuentran dos actividades de glutamino sintetasa, por lo que resulta fundamental determinar en que condiciones interviene cada una, a fin de atribuirles un papel fisiológico. Encontramos que las dos glutamino sintetetas se regulan de manera complementaria y coordinada; así la GSI se induce en medio rico y en limitación de amonio, condiciones en donde consideramos se encuentra un exceso de esqueletos de - -

carbono intracelular y en medio mínimo, en donde seguramente el carbono que se genera es menor, la GSI se va inactivando durante el crecimiento.

Se ha encontrado que la GSI de *Rhizobium* tiene una estructura semejante a la GS de *E. coli* (52), también se ha visto que ambas GS presentan un mecanismo de control sobre la actividad enzimática, mediado por un sistema de cascada que involucra la adenilación y desadenilación de cada una de las subunidades de la enzima (53). Este sistema responde a la disponibilidad de la fuente de nitrógeno, permitiendo una respuesta muy rápida a cambios en las condiciones ambientales. Así en altas concentraciones de glutamina y bajas concentraciones de α -cetoglutarato se estimula la reacción de adenilación, mientras que en bajas concentraciones de glutamina y altas concentraciones de α -cetoglutarato y ATP se estimula la reacción de desadenilación. Se propone que existe un umbral en la relación de α -cetoglutarato/glutamina a partir del cual se induce la adenilación (53).

Además de este sistema de adenilación para regular la actividad de la GS, existe un sistema genético muy complejo, que se encarga de regular la síntesis de la enzima, en el cual participan varias proteínas reguladoras, codificadas por los genes gln L y gln G los cuales se encuentran en un operón junto con el gene estructural de la GS, y gln F el cual se encuentra en otro punto del cromosoma (21). Se ha visto que estos genes también responden a las condiciones nitrogenadas (21), así en

E. coli se ha visto que en condiciones limitantes de nitrógeno los niveles de la enzima se elevan y el grado de adenilación es muy bajo, por el contrario cuando el nitrógeno se encuentra en exceso los niveles de la GS disminuyen y la enzima presenta un alto grado de adenilación (21). Es importante mencionar que estas proteínas reguladoras de la síntesis de GS, también se encargan de regular la expresión de otros sistemas que también responden a la disponibilidad del nitrógeno, a estos sistemas se les conoce como sistemas Ntr, entre los cuales se encuentra la fijación del nitrógeno (23). Así en *Klebsiella pneumoniae* se ha encontrado que las proteínas codificadas por los genes gln G y gln F inducen la expresión del operon nif L nif A, el cual regula la expresión de los otros operones nif, resultando así en la expresión de la nitrogenasa.

Hemos visto que la GSI de *Rhizobium* difiere de la GS de *E. coli* en su regulación, tanto a nivel de su actividad, como a nivel de su síntesis, así hemos encontrado que la GSI se adenila cuando las células se transfieren a medio mínimo, suplementando con una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono, independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada. Proponemos que la GSI solo se encuentra desadenilada cuando existe una relación alta de α -cetoglutarato/glutamina como sucede en medio rico o en limitación de amonio. Cuando el cultivo se transfiere a medio mínimo, la concentración de esqueletos de carbono baja, lo cual disminuye la relación de α -cetoglu-

rato/glutamina y se dispara la adenilación de la GSI (Fig. 10). Esto sugiere que la GSI de *Rhizobium* posiblemente responde diferentemente a los cambios en la relación α -cetoglutarato/glutamina pues cuando *E. coli*; es crecida en medio mínimo presenta una actividad de GS desadenilada que depende de la fuente de nitrógeno utilizada. La adenilación de la GS de *Rhizobium* en medio mínimo se puede explicar alternativamente debido a -- que en este microorganismo el flujo de carbono es diferente al de *E. coli*, ya que carece de la vía Embden-Meyerhof por lo que la glucosa se cataboliza únicamente por la vía Entner-Doudoroff, y posiblemente cambie la relación α -cetoglutarato/glutamina.

Por otro lado la regulación de la GSI a nivel de su síntesis también es diferente en *Rhizobium*, ya que los niveles de GSI no varían con las diferentes fuentes de nitrógeno; si se mide la actividad de transferasa de la GSI, en presencia de Mn^{+2} (correspondiente a la actividad de todas las subunidades, tanto adeniladas como desadeniladas) se observa que la actividad es igual en todas las fuentes de nitrógeno durante todo el crecimiento en medio mínimo. Esto significa que durante el crecimiento de *Rhizobium* en medio mínimo, la GSI es transcrita a niveles constitutivos durante todo el crecimiento, pero debido a que es adenilada es inactiva. ¿Cuál es la ventaja de sintetizar una enzima que después va a ser inactivada? Es posible que el operón A L G sea una secuencia muy conservada durante la evolución y que la GSI se transcribe debido a que se

requiere expresar los genes reguladores que estan despues de ella, formando parte del mismo operón (21).

Rhizobium puede adenilar a las GS1 cuando baja la relación α -cetoglutarato/glutamina sin afectar el crecimiento, ya que posee otra glutamino sintetasa (la GSII) que es capaz de inducirse en estas condiciones. La inducción de la GSII en medio mínimo, responde inversamente proporcional a la cantidad de amonio disponible (Fig. 11). Es por esto que la GSII juega un papel fundamental en la asimilación de amonio en el crecimiento en medio mínimo.

Encontramos que la GSII además de regularse a nivel de síntesis dependiendo de la fuente de nitrógeno, se regula también a nivel de inactivación de la actividad enzimática. El sistema de inactivación de la GSII se activa al agregar un exceso de amonio al medio (Fig. 17). En *E. coli* se han hecho estudios de la cinética del sistema de adenilación, en donde al agregar un exceso de amonio a un cultivo creciendo con la GS inducida, se sintetiza una gran cantidad de glutamina y se depletan las pozas de ATP. La glutamina acumulada causa una disminución en la relación acetoglutarato/glutamina, lo cual induce que funcione el sistema de adenilación de la GS (53). Seguramente el exceso de amonio agregado al medio cuando *Rhizobium* crece con la GSII inducida, causa también un aumento en la concentración intracelular de glutamina y una disminución en los esqueletos de carbono y en el estado energético -

celular. Este cambio podría ser el responsable de que se dispare el sistema de inactivación de la GSII (Tabla 2).

Hemos encontrado que el sistema de inactivación de la GSII también se activa cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria del crecimiento (Fig. 18). El hecho de que este sistema se active al final del crecimiento, nos sugiere que intracelularmente se están dando las mismas condiciones que cuando se agrega un exceso de amonio, es decir acumulación de glutamina y depleción de esqueletos de carbono y de pozas de ATP.

Para explicar como es que se llegó a tener estas condiciones intracelulares, proponemos que al transferir las células de medio rico a medio mínimo el flujo de carbono se desacopla del flujo de nitrógeno, programando a *Rhizobium* para que se de un shock de amonio, lo cual provoca la adenilación de la GSI y la inactivación durante el crecimiento de la GSII.

Así al transferir las células a medio mínimo se baja la relación α -cetoglutarato/glutamina, esto causa el inicio en la adenilación de la GSI, mientras tanto la GSII se induce. La inducción de la GSII causa que todavía baje más la relación α -cetoglutarato/glutamina, ya que se está sintetizando más glutamina. Esta disminución en la relación α -cetoglutarato/glutamina causa la completa inactivación de la GSI. La GSII llega a inducirse a niveles muy altos y como hay una sola fuente de carbono, se puede suponer que la disponibilidad de α -cetoglutarato y de ATP sea limitada, esto significa que el flujo de - -

carbono sea mas lento en comparación con el flujo de nitrógeno, a tal grado que llegue un momento en que el α -cetoglutarato y el ATP se consuman y se acumule glutamina. De esta manera se obtienen las condiciones necesarias para la activación del sistema de inactivación de la GSII.

De esta manera cuando un cultivo de *Rhizobium* alcanza la fase estacionaria creciendo en medio mínimo, las células cambian su estado metabólico a uno donde además de no asimilar amonio y excretarlo al medio, dejan de crecer, ya que no pueden volver a crecer en medio mínimo, cuando el cultivo se diluye (Fig. 22).

La excreción de amonio al medio solo se observa cuando el aminoácido utilizado como fuente de nitrógeno, contiene más de un átomo de nitrógeno por molécula como glutamina, arginina e histidina. Estos aminoácidos tienen en común que en los primeros pasos de su catabolismo, se libera una molécula de amonio simplemente por una reacción de hidrólisis, en cambio para que se libere una molécula de amonio de aminoácidos con un solo átomo de nitrógeno por molécula, como prolina y glutamato, se requiere el gasto de poder reductor, energía y esqueletos de carbono.

Debido a que con aminoácidos con un solo átomo de nitrógeno por molécula, no se observa excreción de amonio en la fase estacionaria, pensamos que tanto los esqueletos de carbono como el poder reductor, se encuentran en concentraciones

limitantes en la fase estacionaria. La limitación de estos metabolitos, podría deberse a un bloqueo en el flujo de carbono. G. Hernández y J. Mora han encontrado que en *Neurospora crassa* cuando se suspende la síntesis de glutamina, se provoca un bloqueo en el flujo de carbono en algún punto de glicólisis (65). Ya que *Rhizobium* suspende la síntesis de glutamina cuando alcanza la fase estacionaria, se podría esperar también un bloqueo en el flujo de carbono. Es interesante que los bacteroides no sintetizan glutamina y son incapaces de metabolizar glucosa (9).

Es posible que las células que alcanzan la fase estacionaria creciendo en medio mínimo, pierdan su capacidad de dividirse (Fig. 22) debido a que no son capaces de sintetizar glutamina.

Debido a que en la fase estacionaria se inactivan las dos glutamino sintetetasas, la poza intracelular de glutamina tiende a depletarse, y si como se propone la GSI de *Rhizobium* se regula por el mismo sistema genético que regula la expresión de la GS de *E. coli* y de *K. pneumoniae* (operon gln A, gln L, gln G y gln F) la expresión constitutiva de la GSI implicaría la producción de las proteínas reguladoras de su expresión. Se tendrían condiciones similares a cuando se induce la hipogenosa de *K. pneumoniae*: bajo glutamina y producción de gln G y gln F. Pensamos que en *Rhizobium* la hidrogenasa se regula de una manera similar, por lo que al inactivarse ambas GS se llegaría a la expresión de la nitrogenasa en la fase estacionaria.

En resumen se propone que las células que alcanzaron la fase estacionaria creciendo con una sola fuente de nitrógeno y de carbono, modificaron su estrategia para manejar el nitrógeno, cambiando del estado de bacteria en vida libre a un estado metabólico semejante al de bacteroide. Esta transición se dió simplemente por cambios en las actividades de las enzimas de asimilación de amonio, provocados por cambios en las concentraciones intracelulares de α -cetoglutarato, glutamina y ATP, como resultado de un desacoplamiento entre el flujo de carbono y el flujo de nitrógeno.

Para probar que esta hipótesis es correcta, es necesario demostrar los siguientes puntos:

1.- Que las pozas intracelulares de α -cetoglutarato, glutamina y ATP en medio mínimo en la fase estacionaria se encuentren en condiciones semejantes a las que se presentan cuando se agrega un exceso de amonio a un cultivo creciendo con la GSI inducida.

2.- Que el flujo de carbono disminuye cuando las células dejan de sintetizar glutamina.

3.- Que la inactivación de la GSII sea un proceso irreversible ya que aun y cuando la concentración de glutamina baje en la fase estacionaria, la GSII no se puede volver a inducir. Cuando las células de la fase estacionaria se diluye en medio fresco no pueden volver a crecer.

4.- Demostrar que durante el crecimiento se están sintetizando las proteínas regulatorias codificadas por gln G y - - gln F, que inducen la expresión de gln A y posteriormente de los genes nif.

5.- Demostrar la presencia del mensajero y/o la actividad de la nitrogenasa en las células de la fase estacionaria.

6.- Demostrar que mutaciones puntuales estructurales - en la actividad de la GSI, no afectan la producción de nitrogenasa, mientras que mutaciones polares que también afectan la -- producción de las proteínas reguladoras codificadas por gln G y gln L afectan la expresión de la nitrogenasa.

REFERENCIAS .

- 1.- J.E.Beringer, N.Brewin, A.W.Johnston, H.M.Shulman. The - - *Rhizobium*-legume symbiosis. Proc. R. Soc. Lond. 204:219-233, - 1979.
- 2.- F.B.Dazzo, D.H.Hubbell. Cross reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium-clo-*
ver association. App. Microbiol. 30:1017-1033, 1975.
- 3.- C.P.Vance. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? Ann. Rev. Microbiol. 37:399-424, 1983.
- 4.- G.Martinez de Drets, A.Arias. Enzymatic basis for differen-
tiation of *Rhizobium* into fast and slow growing groups. J. Bact. 109:467-470, 1972.
- 5.- K.Tuzimura, H.Meguro. Respiration substrates of *Rhizobium* -
in the nodules. J. Biochem. 47:391-397, 1970.
- 6.- D.K.Stumpf, R.H.Burris. The organic acid content of soybeans
nodules, roots, stems and leaves. Anal. Biochem. 95:311-315, 1979.
- 7.- A.Gardiol, A.Arias, C.Cerveñasnsky, G.Martinez de Drets. --
Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bact.-
151:1621-1623.
- 8.- T.M.Finan, J.M.Wood, D.C.Jordan. Symbiotic properties of C₄-
dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bact. 154:1403-1413, 1983.

- 9.- C.W.Ronson, S.B.Primrose. Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii* : identification and symbiotic properties of mutants. J. Gen. Microbiol. 112:77-88,1979.
- 10.- J.E.Urban, F.B.Dazzo. Succinate induced morphology of *Rhizobium trifolii* 0403 resembles that of bacteroids in clover nodules. App. Env. Microbiol. 44:219-226, 1982.
- 11.- J.Wittenberg. Facilitated oxygen diffusion, the role of --leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean roots nodules. J. Biol. Chem. 249:4057-4066, 1974.
- 12.- T.Ruiz Argueso, D.W.Emerich, H.J.Evans. Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. Biochem. Biophys. Res. Comm. 86:259-264, 1978.
- 13.- C.M.Brown, M.J.Dilworth. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86:39-48, 1975.
- 14.- F.O'Gara, K.T.Shanmugan. Regulation of nitrogen fixation by *Rhizobia*, export of fixed N_2 as NH_4 . Biochem. Biophys. Acta. 437: 313-321, 1976.
- 15.- R.C.van der Bos, W.J.Broughton. Viability of *Rhizobium leguminosarum* endosymbionts in different stages of development. - Arch. Microbiol. 129:349-352, 1981.
- 16.- H.C.Winter, R.H.Burris. Nitrogenase. Ann. Rev. Biochem. 45: 409-425, 1976.

- 17.- H.Haaker, C.Veeger. Enzymology of nitrogen fixation. *Tibs.* April 1984, 188-192.
- 18.- C.Morandi, R.B.Goldberg. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as regulator of nitrogenase synthesis. *J.Bact.* 120:815-821, 1974.
- 19.- K.T.Shanmugan, C.Morandi. Aminoacids as repressors of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Bioch. Biophys. Acta.* 437:322, 1976.
- 20.- D.K.Kleiner. Regulation of ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria II. *Arch. Microbiol.* 111:85-91,1976.
- 21.- B.Magasanik. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16:135-168, 1982.
- 22.- Y.Chen, K.Backman, B.Magasanik. Characterization of a gene, gln L, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J.Bact.* 150:214-220,1982.
- 23.- N.McFarland, L.McCarter, A.Arts, S.Kustu. Nitrogen regulatory locus gln R of enteric bacteria is composed cistrons ntxB and ntxC : identification of their protein products. *Proc. Acad.Sci. USA* 78:2135, 1981.
- 24.- G.R.Wei, S.Kustu. Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory gene, ntxC that is near gln A. *Mol.Gen. Genet.* 183:392-399, 1981.

- 25.- R.Dixon, R.Eady, G.Espin, S.Hill, M.Iaccarino, D.Kahn, M. Merrick. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. *Nature* 286: 128-132, 1980.
- 26.- M.Merrik, S.Hill, H.Hennecke, D.Kahn, R.Dixon, C.Kennedy. Represor properties of the *nifC* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 185:75-81, 1982.
- 27.- R.A.Ludwig, E.R.Signer. Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Nature* 267:245-247, 1977.
- 28.- A.Kondorosi, Z.Savb, G.B.Kiss, R.A.Dixon. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Molec. Gen. - Genet.* 151:221-226, 1977.
- 29.- R.A.Ludwig. *Rhizobium* free-living nitrogen fixation occurs in specialized nongrowing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:1566-1569, 1984.
- 30.- G.Martinez de Drets, A.Arias. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow growing groups. *J.Bact.* 109:467-470, 1972.
- 31.- R.Haselkorn. Regulation of heterocyst differentiation in cyanobacteria. *Microbiology* 170-174.
- 32.- R.Haselkorn. Heterocyst. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:319-344, 1978.
- 33.- Tyler. regulation of the assimilation of nitrogen compounds.

Ann. Rev. Biochem. 47:1127-1161, 1978.

34.- J.L.Meers, D.W.Tempest, C.M.Brown. Glutamine (amide):2-oxo-glutarate amine transferase oxidoreductase (NADPH), an enzyme - involved in the syntesis of glutamate by some bacteria. J. Gen. Microbiol. 64:187-194, 1970.

35.- P.J.Senior. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with continuous culture technique. J.Bact. 123:407-418, 1975.

36.- D.R.Dean, A.I.Aronson. Selcction of *Bacillus subtilis* mutants impaired in ammonia assimilation. J.Bact. 141:985-988, 1980.

37.- K.W.Thomulka, A.G.Mont. J.Bact. 109:25-33, 1972.

38.- R.J.Roon, H.L.Even, F.Larimore. Glutamate synthase: properties of the reduced nictinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bact. 118:89-95, 1974.

39.- K.M.Sanwal, E.Smith. The ocurrence of two different glutamic dehydrogenase in *Neurospora crassa*. Can. J. Microbiol.7:319-328, 1961.

40.- G.Hummlet, J.Mora. NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. Bichem. Biophys. Res. Comm. 92:127-133, 1980.

41.- G.Davila, M.Lara, J.Guzman, J.Mora. Relation between structure and funtion of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92:134-140, 1980.

- 42.- Limon-Lason, M.Lara, B.Resendiz, J.Mora. Regulation of glutamine synthetase in fed-batch cultures of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 78:1234-1240, 1977.
- 43.- R.Palacios. *Neurospora crassa* glutamine synthetase purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure. J.Biol. Chem. 251:4787-4791, 1976.
- 44.- F.Sanchez, E.Calva, M.Campomanes, L.Guzman, J.L.Saborio, R. Palacios. Heterogeneity of glutamine synthetase polipeptides in *Neurospora crassa*. J.Biol. Chem. 255:2231-2234, 1980.
- 45.- M.Lara, L.Blanco, M.Campomanes, E.Calva, R.Palacios, J.Mora. Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. J.Bact. 150:105-112, 1982.
- 46.- A.Lmnitz. Tesis de licenciatura en Investigación biomédica basica. UACP y P, CCH, UNAM. 1983.
- 47.- R.Donald, R.Ludwig. *Rhizobium* sp strain ORS571 Ammonium assimilation and nitrogen fixation. J. Bact. 158:1144-1151, 1984.
- 48.- R.A.Ludwig. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. J.Bact. 135:114-123, 1978.
- 49.- F.Vairinhos, B.Bhandari, D.J.Nicholas. Glutamine synthetase glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in *Rhizobium japonicum* strains grow in cultures and in bacteroids from root nodules of *Glycine max*. Planta. 159:207-215, 1983.
- 50.- F.O'Gara, K.T.Shanmugam. Control of symbiotic nitrogen fixa

- tion in *Rhizobia*, regulation of NH_4^+ assimilation. *Biochem. Biophys. Acta.* 451:342-352, 1976.
- 51.- H.Ali, C.Niel, J.B.Guillaume. The pathways of ammonia assimilation in *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 129:391-394, 1981.
- 52.- R.A.Darrow. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. *Glutamine metabolism, enzymology and regulation.* Academic Press 139-163, 1980.
- 53.- S.Prusine, E.R.Stadtman. The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press N.Y. 9-64, 1973.
- 54.- G.Fulk, B.C.Johanson, S.Nord Lung. The role of glutamine synthetase in the regulation of nitrogenase activity (switch off effect) in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 132:251-253, 1982.
- 55.- R.Wax, L.Synder, L.Kaplan. Inactivation of glutamine synthetase by ammonia shock in the gram positive bacterium *Streptomyces cattleya*. *App. Env. Microbiol.* 44:1004-1006, 1982.
- 56.- F.Wedler, D.S.Shreve, K.Erdelsky Fisher, D.J.Merkler. Complementarity of regulation for the two glutamine synthetase from *Bacillus caldolyticus* an extreme thermophile. *Arch. Biochem. Biophys.* 211:276-278, 1981.
- 57.- E.Morett. Tesis de licenciatura en Investigación Biomedica Basica UACPyP del CCH, UNAM. 1984.
- 58.- O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr, R.J.Rondall. *J.Biol.*

Chem. 193:265-275, 1951.

59.- F.Wedler, R.Denman, W.Gary Roby. Glutamine synthetase from ovine Brain is a manganese (II) enzyme. *Biochemistry*. 21:6389-6396, 1982.

60.-

61.- A.Meister. Catalytic mechanism of glutamine synthetase over view of glutamine metabolism. *Glutamine metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press N.Y. 1-40, 1980.

62.- E.Martinez, M.A.Pardo, R.Palacios, M.A.Cevallos. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J.Gen. Microbiol.* en prensa, 1985.

63.- G.Soberon. Tesis de maestria en Investigación biomédica básica, UACPyP del CCH, UNAM, 1983.

64.- M.J.Dilworth, R.A.Glenn. Movements of ammonia in *Rhizobium leguminosarum*. *J.Gen. Microbiol.* 128:29-37, 1982.

65.-G.Hernandez, J.Mora. "Regulation of glutamine synthesis its effect on nitrogen and carbon metabolism in *Neurospora crassa*. *J.Bact.* en prensa.

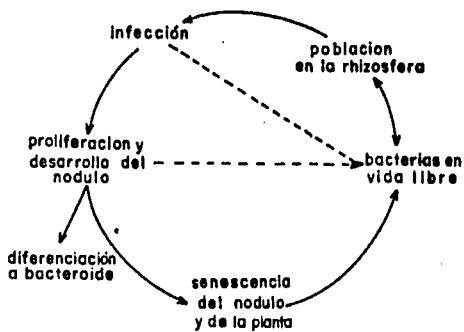


Fig.1 - Ciclo de la vida de Rhizobium.

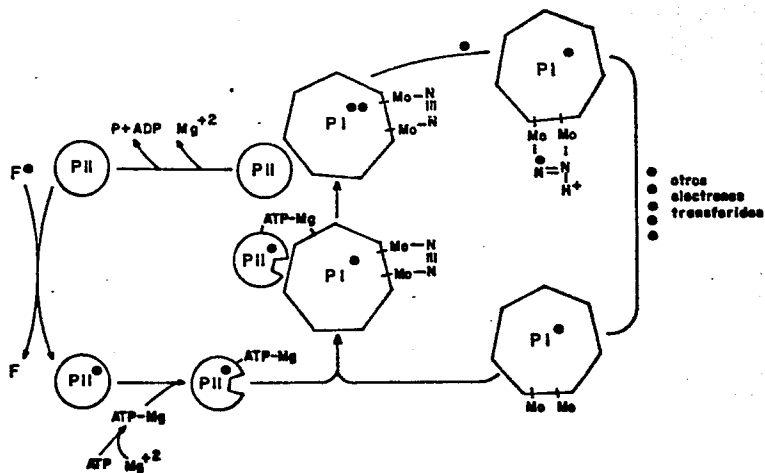


Fig. 2.- Diferentes componentes estructurales y mecanismo de acción de la nitrogenasa.

PI: Componente I, contiene molibdeno (Mo) y tiene afinidad por una molécula de nitrógeno atmosférico ($N \equiv N$). PII: Componente II al cual se une ATP y magnesio (Mg). F: Donador de electrones representados como (•).

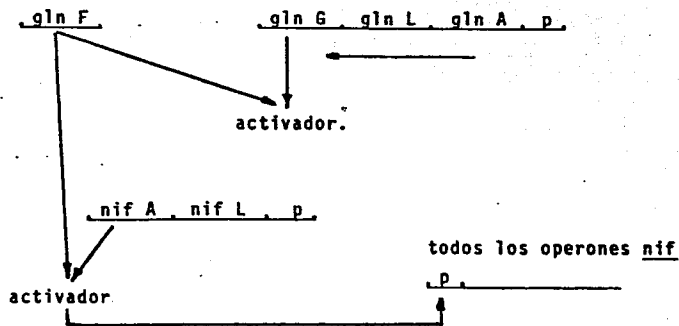


Fig.3.- Esquema del modelo propuesto para la activación de la transcripción de los genes *nif*. R.Dixon (25).
p: promotor.

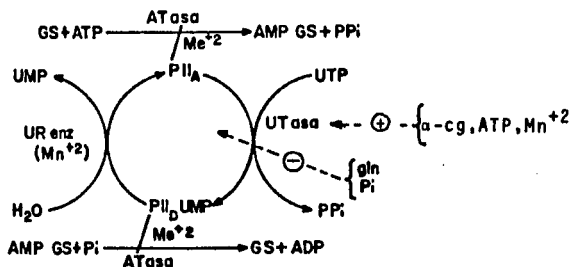


Fig.4.- Esquema del sistema de adenilación descrito para la GS de *E.coli*. A.Ginsburg, E.R.Stadtman (53). ATasa: Adenil Transferasa. PII : Proteína PII no uridilada que interacciona con la Atasa estimulando la adenilación de la GS. PII 'UMP: Proteína -- PII uridilada que interacciona con la Atasa estimulando la desadenilación de la GS. UTasa: Uridil Transferasa.
 ← ⊕ : Activación de la enzima. ← ⊖ : Inhibición de la enzima. α-cg: α-cetoglutarato, Mn²⁺: manganeso, gln: glutamina.

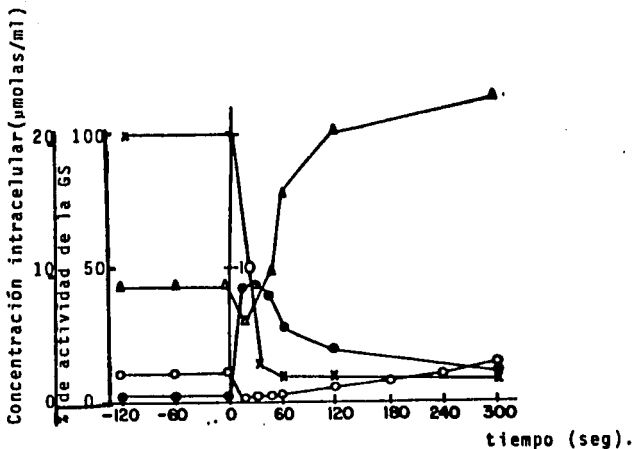


Fig. 5.- Cambios en las pozas de glutamina, glutamato y ATP durante la inactivación de la GS de *E. coli*. R.M.- Wohlhueter, H. Schutt, H. Holzer (53).

El cultivo se precreció en prolina 15 mM por 12 h. al tiempo cero (t₀) se le agregó un exceso de amonio (10 mM NH₄Cl). La actividad de la GS (x) y la concentración intracelular de glutamato (Δ), glutamina (●) y ATP (o) se determinaron a diferentes - - tiempos, antes y después de agregar el amonio.

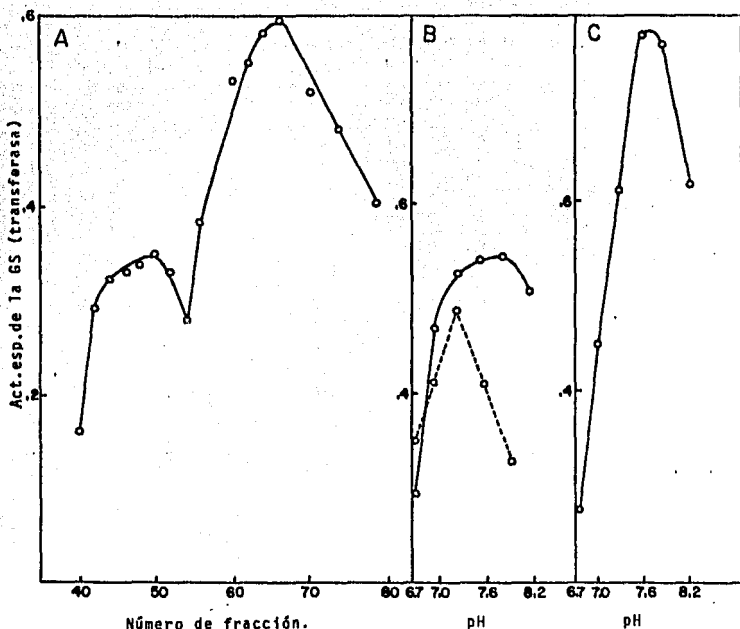


Fig.6.- Separación de las GS I y GS II por intercambio iónico y efecto del pH en la actividad de las enzimas.

A) Actividad específica presente en las diferentes fracciones eluidas de una columna de DEAE-celulosa como se indica en Materiales y Metodos.
 B) Actividad específica de diferentes preparaciones de la GS I según el pH de la mezcla de reacción. (—o—) Preparación obtenida después de aluir de una columna de DEAE-celulosa. (--o--) Preparación obtenida al inactivar la GS II de un extracto libre de células por calor. (Mat. y Metodos).
 C) Actividad específica de una preparación de la GS II eluida de una columna de DEAE-celulosa según el pH de la mezcla de reacción.

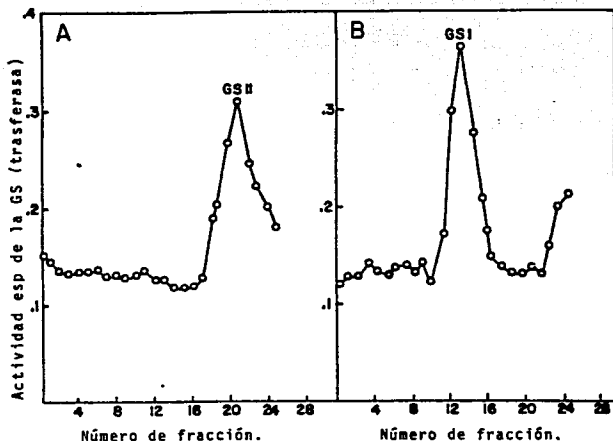


Fig. 7.- Sedimentación en gradientes de sacarosa de la GS después de someterla a una cromatografía de afinidad.

Un extracto crudo que contenía la GS I y la GS II se sometió a una cromatografía de afinidad por una columna de sefarosa-ac.antranílico que se eluyó con AMP (Materiales y Metodos). La actividad de la GS se determinó tanto en las fracciones del lavado de la columna como en las fracciones obtenidas después de eluir con AMP. Las fracciones con actividad se juntaron y se sedimentaron en un gradiente de sacarosa, el cual se fraccionó y se determinó la actividad de la GS por el ensayo transferasa. A) Sedimentación de la GS que no tuvo afinidad por sefarosa-antranílico. Se identificó como GS II según su peso molecular (o). B) Sedimentación de la GS eluida de la columna de sefarosa-antranílico. Se identificó como GS I según su peso molecular (o).

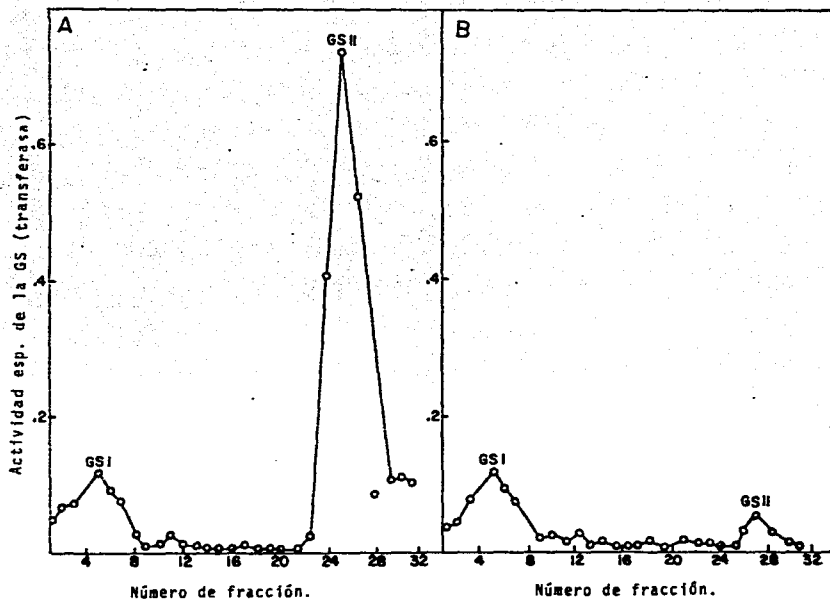


Fig. 8.- Sedimentación en gradientes de sacarosa de la GS I y GS II.

Las GSs presentes en un extracto crudo (A) y de un extracto crudo previamente calentado a 50°C durante una hora (B) se sedimentaron en gradientes de sacarosa (Materiales y Métodos). Los gradientes se fraccionaron y se les determinó la actividad de la GS por el ensayo de -transferasa. Se indica la fracción donde migran la GS I y la GS II según su peso molecular.

FUENTE DE
NITROGENO:

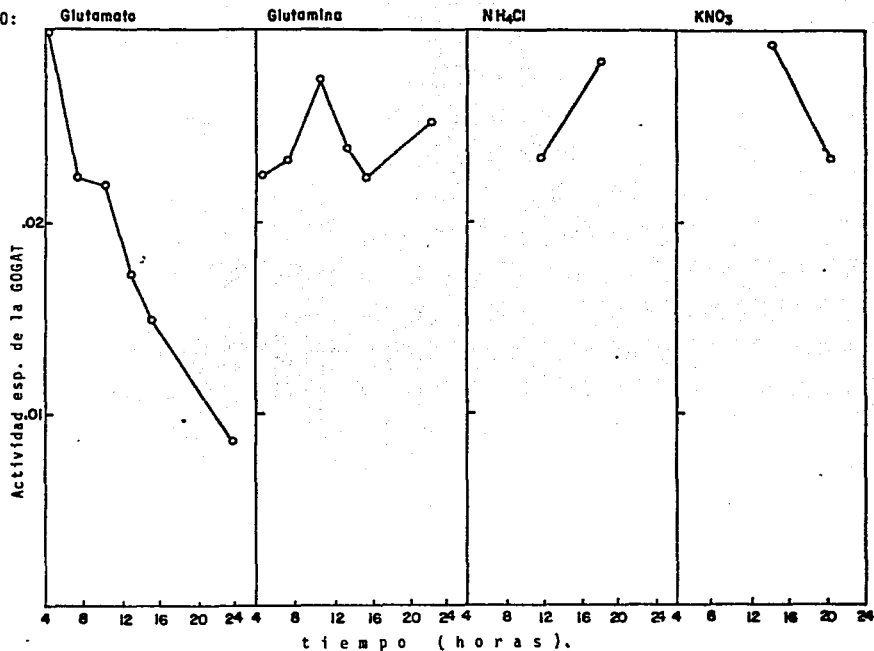


Fig.9.- Actividades específicas de la GOGAT, durante el crecimiento en diferentes condiciones nitrogenadas. Los cultivos se crecieron hasta 24 horas en las fuentes de nitrógeno que se indican. La act. de GOGAT se determinó a distintos tiempos del crecimiento (Mat. y Met).

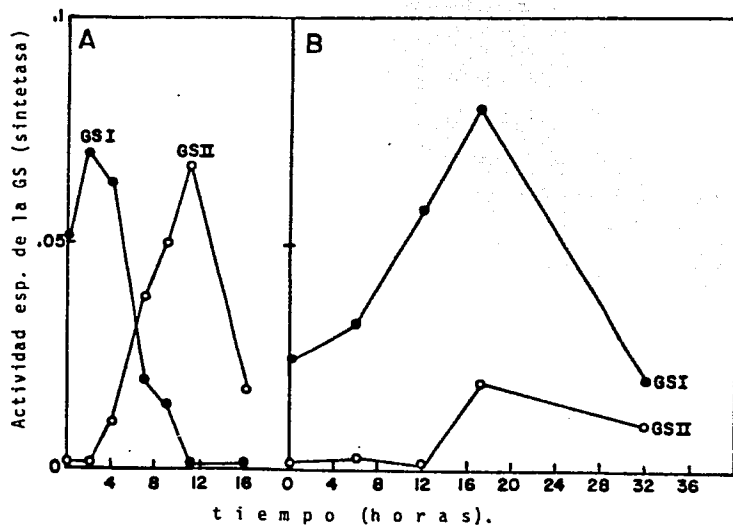


Fig.10.- Actividades de la GS I (●) y de la GS II (○) durante el crecimiento en diferentes condiciones nitrogenadas.

A) Cultivo con glutamato y succinato inoculado con células precrecidas 24 h. en medio rico. B) Cultivo limitado de amonio, alimentado con $0.003 \mu\text{mol NH}_4\text{Cl/ml}\cdot\text{h.}$)

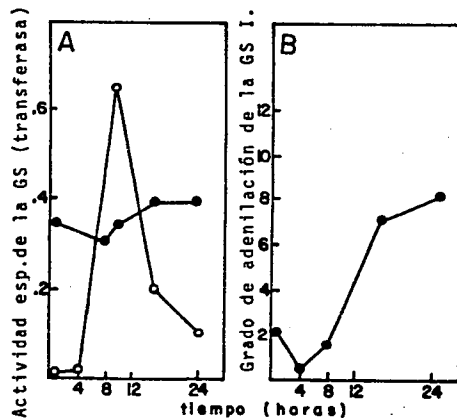


Fig. 11.- Actividad específica de las dos GS y grado de adenilación de la GS I.

Los cultivos se crecieron durante 24 h. en medio mínimo con succinato y glutamato. A) Actividad específica de la GS I (●) y de la GS II (○) determinadas por el ensayo de transferasa. B) Grado de adenilación de la GS I determinado como se indica en Materiales y Métodos.

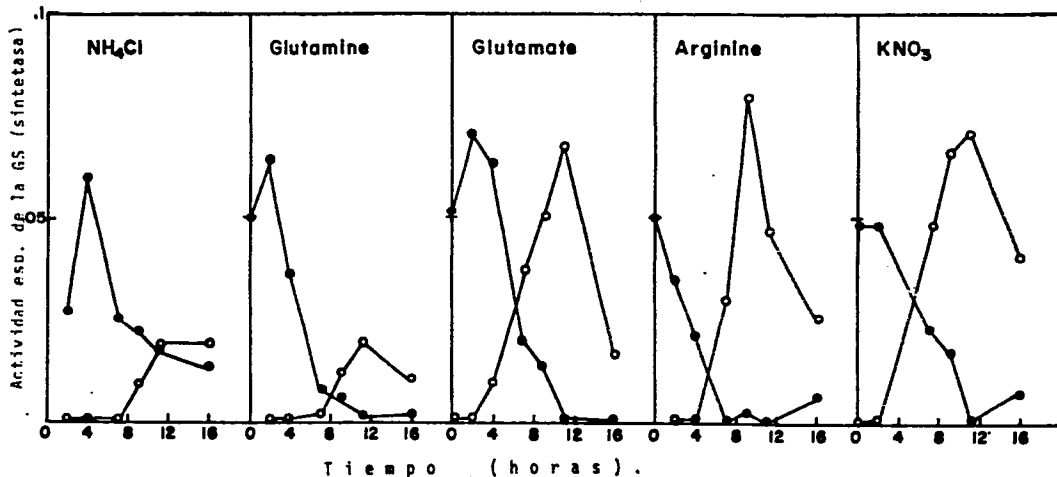


Fig.12.- Actividades específicas de la GS I (●) y de la GS II (○) durante el crecimiento en las diferentes fuentes de nitrógeno indicadas.

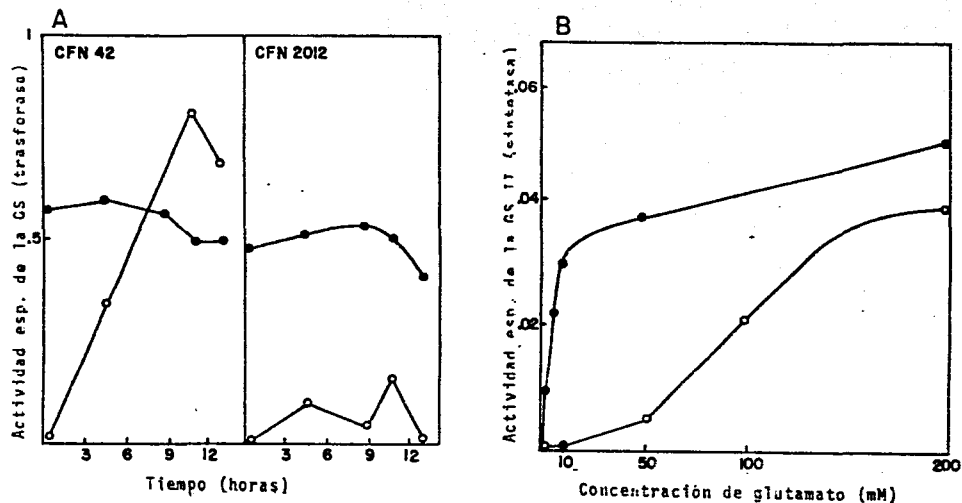


Fig.13.- Actividad específica de la GS I y GS II durante el crecimiento y efecto de la concentración de glutamato en la actividad *in vitro* de la GS II.

A) La cepa silvestre CFN42 y la cepa mutante CFN2012 se crecieron en medio mínimo con succinato y glutamato durante 12 h. Las actividades de la GS I (●) y la GS II (○) se determinaron por el ensayo de transferasa a distintas horas del crecimiento de cada cepa.

B) La actividad de la GS II, tanto de la cepa silvestre CFN42 (●) como de la cepa mutante CFN2012 (○), se determinó por el ensayo de sintetasa variando la concentración de glutamato presente en la mezcla de reacción.

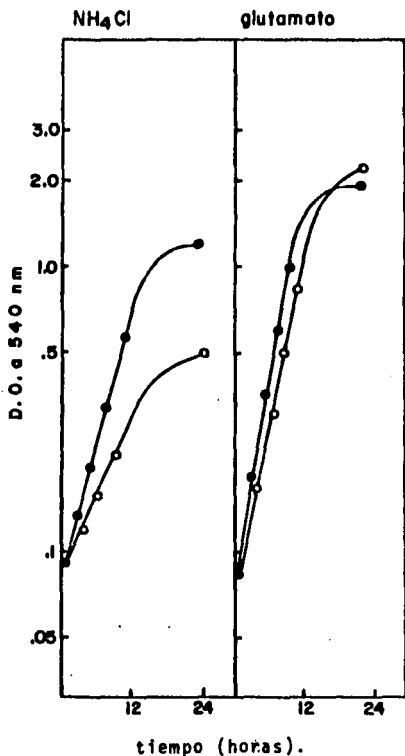


Fig.14.- Crecimiento de la cepa silvestre CFN42 (●) y de la cepa mutante CFN2012 (○) en diferentes fuentes de nitrógeno.

Los cultivos se crecieron durante 24 h. en medio mínimo con succinato y con cloruro de amonio ó con glutamato.

CEPA:

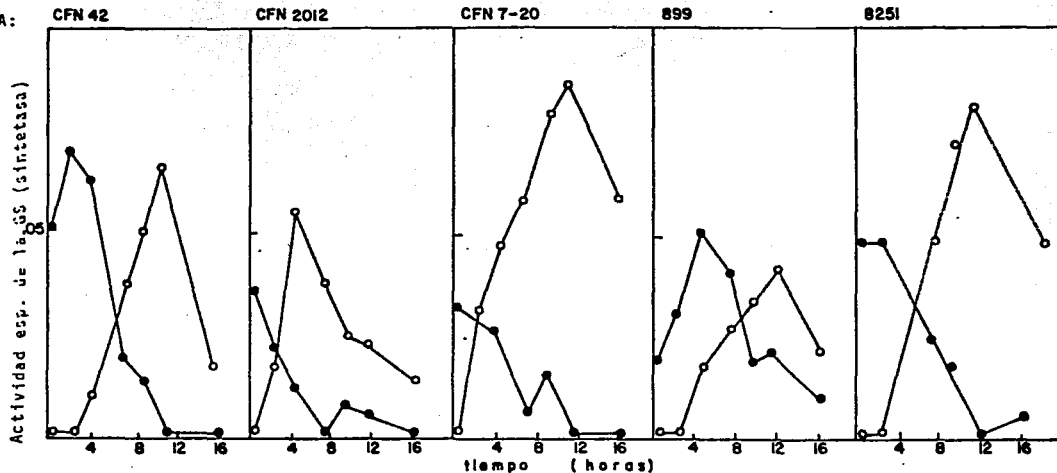


Fig. 15.- Actividad específica de la GS I (●) y GS II (○) en diferentes cepas.

Cada uno de los cultivos se creció en medio mínimo con succinato y glutamato durante 16 h., Las actividades de las GS I y GS II se determinaron por el ensayo de sintetasa a distintas horas del crecimiento.

CEPA :

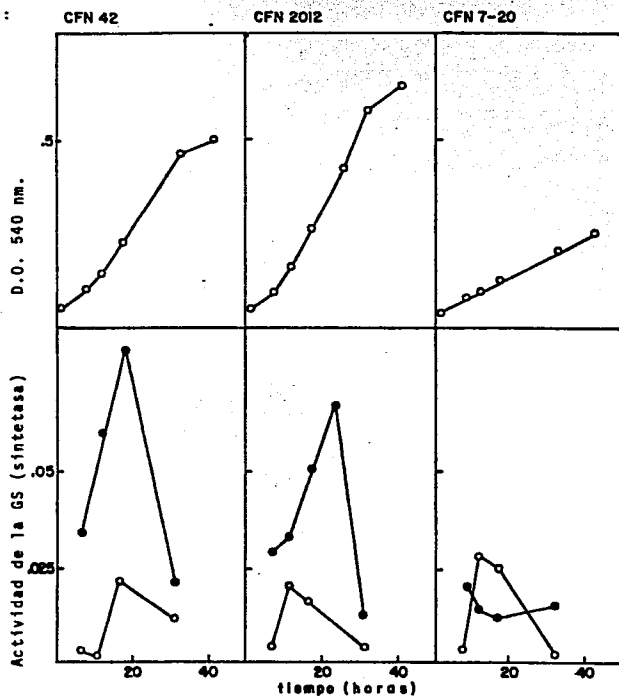


Fig.16.- Crecimiento (paneles superiores) y actividad específica de las GSs (paneles inferiores) de las diferentes cepas indicadas. Los cultivos se crecieron limitados de NH_4 durante 40 h. La actividad de la GS I (●) y de la GS II (○) se determinaron por el ensayo de sintetasa.

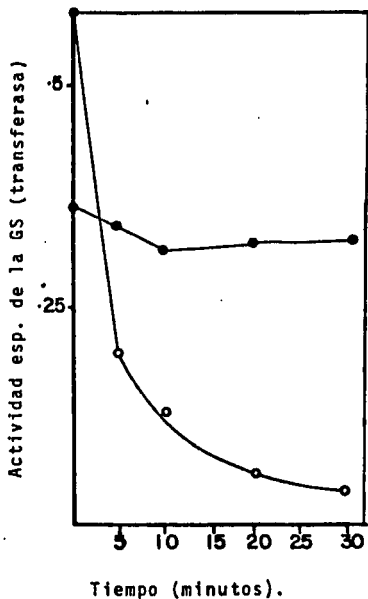


Fig. 17.- Efecto de un exceso de amonio sobre la actividad de la GS I y la GS II.

El cultivo se creció durante 10 h. en medio mínimo con succinato y glutamato y a este tiempo (tiempo 0) se le agregó un exceso de amonio (10 mM NH_4Cl). La actividad de la GS I (●) y de la GS II (○) se determinó por el ensayo de transferasa a diferentes tiempos después de agregar amonio.

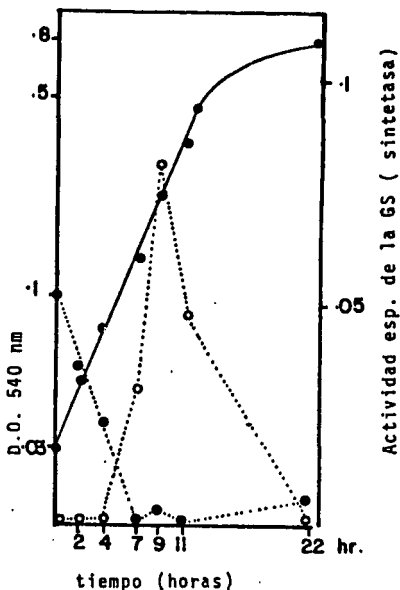


Fig. 18.- Actividades de la GS I (●) y de la GS II (○) a distintos tiempos del crecimiento.

El cultivo se creció en succinato mas glutamato durante - 24 h. determinando el crecimiento por D.O. 540 nm (—●—), y la actividad de las GSs por el ensayo de sintetasa(----)

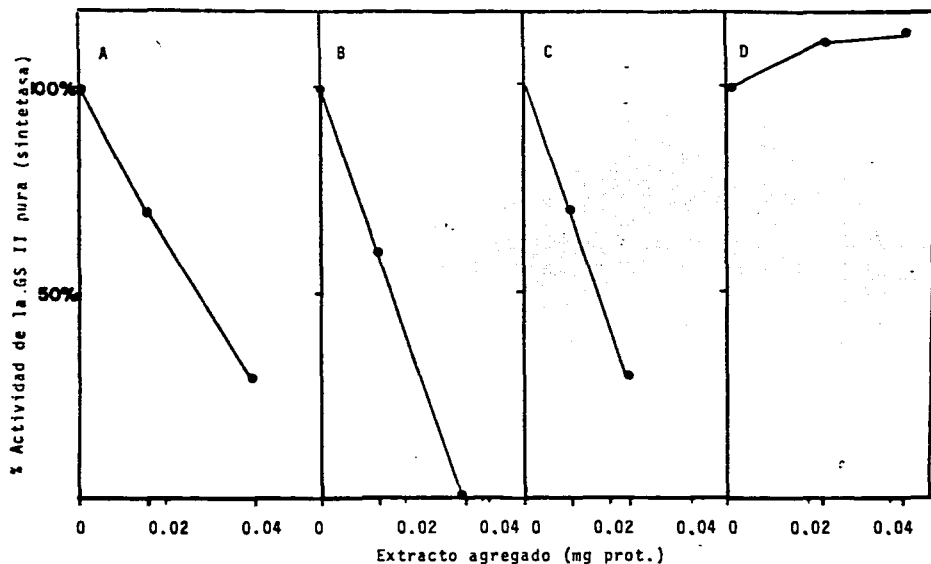


Fig.19.-Actividad específica de una preparación pura de la GS II mezclada con diferentes cantidades de extractos crudos provenientes de distintas cepas. La GS II de la cepa silvestre CFN42 se purificó (D.Enriquez, J.Mora en preparación) y muestras de esta preparación se incubaron por 30 min. a 30°C con diferentes cantidades de extractos crudos obtenidos de distintas cepas. Posteriormente se cuantificó la actividad de la GS II pura, restandole la actividad total de la GS de los extractos. La GS II pura se mezcló con los extractos de las cepas: A) CFN42 shock con exceso de amonio B) CFN2012, C) CFN42 fase estacionaria, D) CFN42 con la GS II inducida.

FUENTE DE NITROGENO :

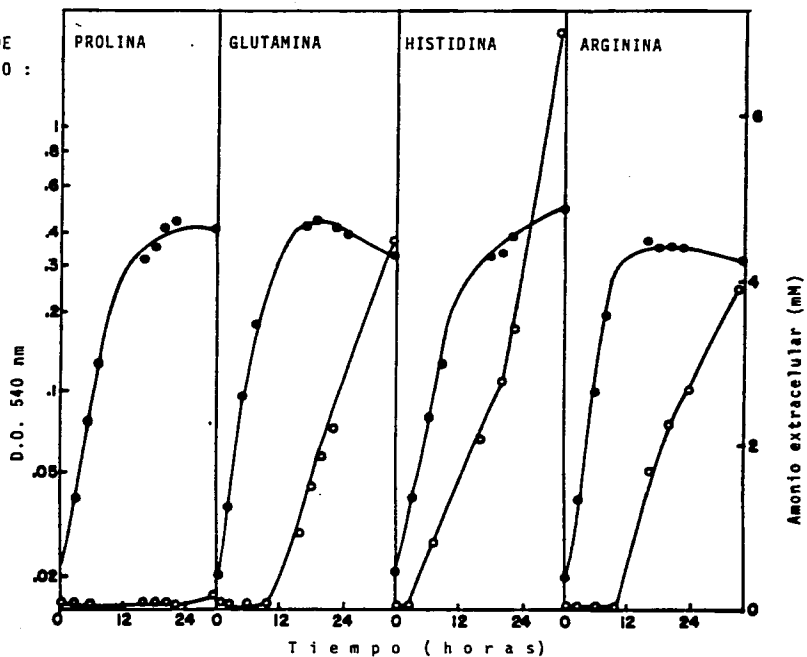


Fig. 20.- Crecimiento y excreción de amonio en las diferentes fuentes de nitrógeno indicadas. El crecimiento se determinó por D.O. 540 nm (●) y el amonio extracelular se determinó utilizando un electrodo Orion con una membrana específica para este compuesto (Materiales y Métodos) (○)

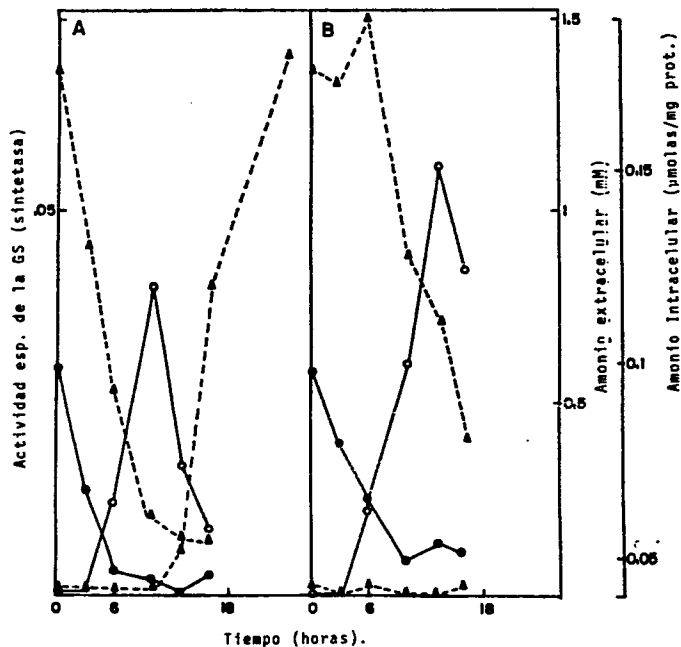


Fig. 21.- Actividad de la GS I (e) y de la GS II (o) y concentraciones intracelular (Δ) y extracelular (\triangle) de amonio. Durante el crecimiento en diferentes condiciones. Los cultivos se crecieron durante 18 h. en medio mínimo con arginina (A) o con glutamato (B). Las actividades de GS se determinaron por el ensayo de sintetasa.

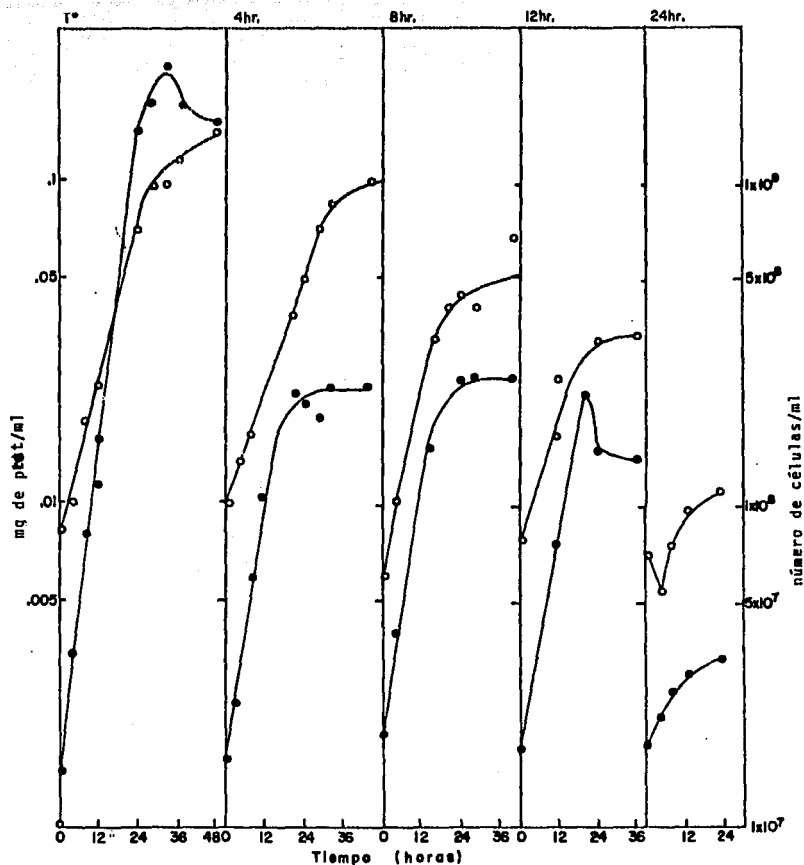


Fig. 22.- Crecimiento de la cepa silvestre en medio mínimo y de diluciones del cultivo original en el mismo medio. El cultivo con succinato más amonio se inoculó con células precrecidas 24 h. en medio rico (1°). Cada 4 h. de crecimiento se tomó el volumen necesario para tener el mismo número de células con que se inoculó el primer cultivo y se cambiaron a medio fresco. El tiempo en que se hizo la dilución se indica en la parte superior. El crecimiento se midió por num; de células (●) y por concentración prot (○).

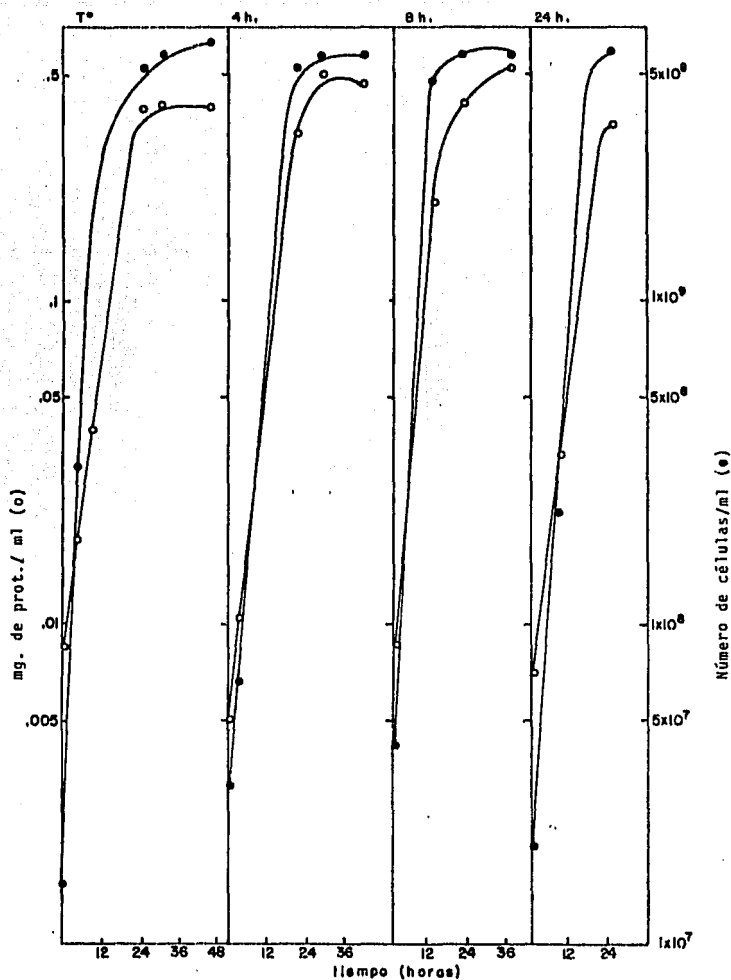


Fig. 23.- Crecimiento de la cepa silvestre en medio rico y en el mismo medio después de diluir el cultivo original. El experimento fué igual que la fig. 22 pero utilizando siempre medio rico.

TABLA 1. CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

<u>CEPA <i>R. phaseoli</i></u>	<u>CARACTERISTICAS</u>	<u>ORIGEN</u>
CFN 42	rif ^R aislamiento del campo	Guanajuato, Mex.
CFN 2012	Derivada de CFN42, por inserción de Tn5, Stm ^R Kam ^R	Aislamiento E. Morett (57)
7-20	Sin plásmidos derivada de CFN7, Stm ^R , Rif ^R	Aislamiento G. Soberón (63)
CIAT 899	Sin reiteraciones en el gene H (62) el cual codifica para el componente II de la nitrogenasa	Colombia
8251	Aislamiento del campo (63)	Inglaterra

TABLA 2. Km POR GLUTAMICO Y VIDA MEDIA A 50°C DE LA GS II.

<u>CEPA</u>	<u>FENOTIPO</u>	<u>Km POR GLUTAMATO</u>	<u>VIDA MEDIA 50°C</u>
CFN 42	SILVESTRE	3.7 mM	7 min.
CFN 2012	GS II ALTERADA	120. mM	3 min.
CFN 42	SHOCK NH ₄	100. mM	3 min.