



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: ROMÁRIO DE ARAUJO MELLO

Nº de Identificação:

Endereço para Correspondência: Dept. Bioquímica - IB - UNICAMP

Curso: Biologia Celular e Molecular

Nome do Orientador: Prof. Dr. Quivo S. Tahin

Título da Dissertação ou Tese: Estudo sobre a formação do gama-glutamil hidroxamato catalisada pela glutamina sintetase em vários tecidos animais.

Data proposta para a Defesa: 24 de Novembro de 1978

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

13/11/78

Data

Romário de Araújo Mello

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1/1

Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1/1

Data

assinatura do aluno

Impl - 8.10.92

ROMÁRIO DE ARAUJO MELLO

ESTUDO SOBRE A FORMAÇÃO DO GAMA-GLUTAMILHIDROXAMATO CATALISADA PELA GLUTAMINA SINTETASE EM VÁRIOS TECIDOS ANIMAIS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Q. S. Tahin

CAMPINAS

1978

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meus pais,

por orientar-me em to-
dos os caminhos.

Aos meus irmãos.

À Elizabete,

pelo apoio nos mo-
mentos mais difíceis
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Quivo S. Tahin por orientar-me no caminho da pesquisa e pela amizade que dispensou-me nesses anos de convivência.
- Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. por ter permitido que esse trabalho se realizasse no Departamento de Bioquímica.
- Aos Profs. Drs. Carlos E. Pinheiros, Hebe M. L. de Souza Hiroshi Aoyama e Tomhiko Sekino pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.
- Aos meus amigos: Clara Tahin, Edson Rosa Pimentel, Shirley Maria Recco e Tereza Cristina S. Cavalcanti, pelo apoio, para que este trabalho se tornasse uma realidade.
- Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Maria das Graças Borba e Regina Célia Rosseto pela ajuda dispensada no desenvolvimento deste trabalho.
- A Fundação Educacional de Jaú e a Pontifícia Universidade Católica de Campinas pelo apoio que me deram no decorrer deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1. ABREVIATURAS UTILIZADAS	I
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1. Materiais	9
2.2. Métodos	9
2.2.1. Dosagem de Proteínas	9
2.2.2. Preparação do Extrato Bruto (EB)	10
2.2.3. Determinação da Atividade Enzimática	11
2.2.4. Definição de unidade de GS	12
III. RESULTADOS	13
3.1. Efeito do ADP sobre a atividade da GS	13
3.2. Efeito do pH	13
3.3. Efeito de diferentes ions divalentes sobre a atividade da GS	13
3.4. Efeito da variação da concentração de Mn^{2+} so- bre a atividade da GS	16
3.5. Efeito da concentração de arsenato (Asi) sobre a atividade da GS	17
3.6. Efeito da concentração da hidroxilamina (HA) sobre a atividade da GS	22
3.7. Efeito da concentração da glutamina sobre a atividade enzimática da GS na presença de di- ferentes concentrações de Mn^{2+} . Determinação do K_M e V_{max} das reações.	22

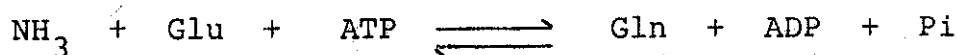
IV. DISCUSSÃO	34
V. RESUMO	40
VI. ABSTRACT	42
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. ABREVIATURAS UTILIZADAS

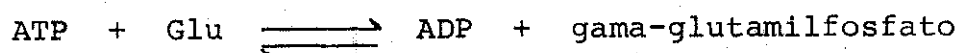
AMP	Adenosina monofosfato
ADP	Adenosina difosfato
Asi	Arsenato inorgânico
ATP	Adenosina trifosfato
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
GHA	gama-glutamilhdroxamato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetase
HA	Hidroxilamina
K_M	Constante de Michaelis
Pi	Fosfato inorgânico
Tris	Tris(hidroximetil)amino metano
V_{MAX}	Velocidade máxima de uma reação enzimática

I. INTRODUÇÃO.

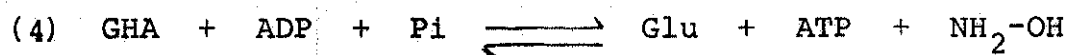
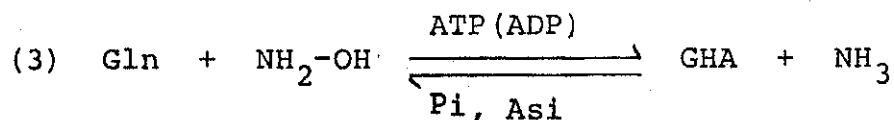
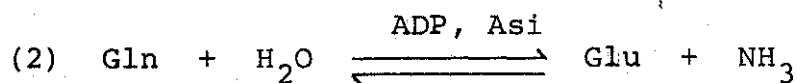
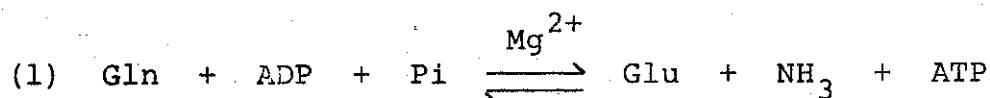
A glutamina (Gln) forma-se a partir do glutamato (Glu) pela ação da glutamina sintetase (GS) [L-glutamato: amônia ligase (ADP) E.C.6.3.1.2.] .

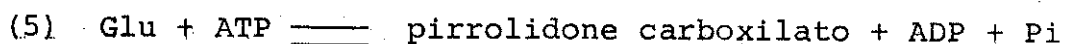


Esta reação é muito complexa e envolve duas ou mais etapas intermediárias, sendo que, o gama-glutamilfosfato funciona como um intermediário ligado à enzima (MEISTER, 1968).



De um modo geral a GS catalisa as seguintes reações de síntese ou de transferência (MEISTER, 1968):





A glutamina sintetase é encontrada no reino vegetal (CALDAS, 1970), no reino animal (RONZIO, 1969; STAHL et al., 1972; DEUEL et al., 1972; TATE et al., 1972; TIEMIER et al., 1972) e em microorganismos (PALACIOS, 1976; QUINTO et al. 1977; RHEE et al., 1978).

A glutamina é um aminoácido que tem um papel fundamental na síntese de purinas, pirimidinas e açúcares-aminados (MEISTER, 1962). Em microorganismos é fonte de átomos de nitrogênio para a biossíntese do triptofano (EDWARDS et al., 1964), ácido adenílico (BUCHANAN, 1960), ácido citidílico (HURLBERT and CHAKROBORTY, 1961), glicosaminas (LELOIR and CARDINI, 1953), histidina (NEIDLE and WAELSCH, 1969) e carbamilmfosfato (PIERRARD and WIANE, 1964). Pode também ser fonte de grupos aminas para a síntese de alanina e glicina (MEISTER, 1962) através de reações de transaminações com piruvato e glioxalato; o alfa-amino-grupo da Gln é uma potencial fonte de nitrogênio para síntese de vários aminoácidos por mecanismos que envolvem reações de transaminações específicas da Gln com alfa-cetoácidos (WOOLFOLK et al., 1966).

Em microorganismos, essa enzima, além de catalisar a formação reversível da glutamina a partir do glutamato e ATP, catalisa ainda, a partir da glutamina, a formação do gama-glutamilhdroxamato e a formação do pirrolidone carboxilato (STADMAN and GINSBURG; 1974 ; RHEE and CHOCK , 1976).

Muitos microorganismos apresentam alta adaptação, possuindo eficientes e flexíveis caminhos metabólicos de interconversão de compostos nitrogenados, nos quais participa a glutamina (WADE et al., 1971; SIMS and FERGUSON, 1974; FERGUSON and SIMS, 1974a; FERGUSON and SIMS, 1974b).

A GS de microorganismos ocorre sob duas formas a forma ativa ou livre e a forma inativa que é covalentemente modificada. A GS é convertida de sua forma ativa, para sua forma inativa, pela transferência de grupamentos adenílicos do ATP para resíduos específicos de tirosina em cada uma das doze subunidades da enzima, para produzir derivados covalentes adenílicos dos grupamentos hidroxílicos fenólicos da tirosina. A enzima pode ser também enzimaticamente desadenilada para sua forma ativa. Ambas, adenilação e desadenilação da GS são catalisadas pela enzima adenil-transferase (ATase) E.C.2.7.7.42 (RHEE et al., 1978).

A habilidade dessa ATase para catalisar a reação mencionada acima é modulada por uma proteína regulatória P_{II} e efetores metabólicos como glutamina e alfa-cetoglutarato (SEGAL et al., 1974). Por outro lado, essa proteína P_{II} existe sob duas formas interconvertíveis, a forma não modificada P_{IIA} , que estimula a adenilação da GS, enquanto que a forma uridinilada P_{IID} é requerida para desadenilação. A interconversão da P_{IIA} e P_{IID} envolve ligação covalente da uridina monofosfato a resíduos específicos da tirosina da proteína P_{II} ou a sua remoção. A reação de ligação é catalisada pela uridil-transferase (UTase) e a de desligamento pela enzima de remoção do uridil (UR) (HOLZER,

1969; MANGUM et al, 1963; ADLER et al, 1975; RHEE et al, 1978)

Em Escherichia coli, a GS exerce primariamente uma regulação em cascata através da adenilação e desadenilação (SHAPIRO et al., 1967; HOLZER, 1969). O AMP exerce retroinibição alostérica sobre a enzima pelo fato de cada uma das doze subunidades idênticas da glutamina sintetase possam ser adeniladas. Essa enzima parece ser uma das mais complexas de todas as enzimas regulatórias já estudadas (MECKE et al., 1966; KINGDON et al, 1967a; KINGDON et al., 1967b; SHAPIRO and STADMAN, 1968 ; HOLZER, 1969).

É possível separar-se por eletroforese de focalização as duas formas de GS, isto é, a adenilada e a desadenilada em Rizzobium japonicum (DARROW and KNOTTS, 1977) e em E. coli (RHEE et al., 1978). A GS de E. coli é constituída de doze subunidades idênticas, cada uma com um peso molecular de 50 mil, arranjadas em duas cadeias hexagonais (WOOLFOLK et al., 1966). O Bacillus caldolyticus também apresenta a GS com um peso molecular de 600 mil, constituída por doze subunidades idênticas com peso molecular de 50 mil (WEDLER et al., 1978).

Em Neurospora crassa a glutamina é considerada como um catabólito final do metabolismo de certos aminoácidos e um precursor para a biossíntese de vários compostos e mesmo macromoléculas, incluindo, proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. O peso molecular da GS desse fungo é de 390 mil (PALACIOS, 1976); ainda em N. crassa demonstrou-se que, quando o fungo cresce em meio cuja única fonte de nitrogênio é o glutamato, a concentração de GS é muito alta,

e é baixa quando a glutamina está presente no meio de cultura (QUINTO et al., 1977).

As glutaminas sintetases dos tecidos animais que são proteínas de menor peso molecular e com menor número de subunidades, parecem não apresentar um mecanismo regulatório tão complexo como a apresentada pela de E. coli (RONZIO, 1969; DEUEL et al., 1972; STAHL et al., 1972; TATE et al., 1972; TIEMEIER et al., 1972a; TIEMEIER et al., 1972b).

A GS de fígado de rato é constituída por oito subunidades, cada uma com um peso molecular de 44 mil. A enzima é ativada pelo alfa-cetoglutarato na presença de Mg^{2+} e Mn^{2+} e é inibida por glicina, L-alanina, L-serina e carbamilmfosfato, sendo que este último só inibe na presença de Mn^{2+} (TATE et al., 1972). É sensível a inibidores como histidina e altas concentrações de glutamina, na presença de Mn^{2+} ; os efeitos inibitórios são maiores quando a concentração de glutamato é limitada durante o ensaio; o alfa-cetoglutarato e citrato podem ativar ou inibir dependendo da concentração dos cátions divalentes Mg^{2+} ou Mn^{2+} presentes durante o ensaio, sugerindo uma interação entre cátions divalentes, enzima, substrato, inibidor e ativador (DEUEL et al., 1972).

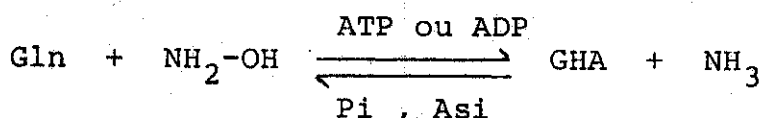
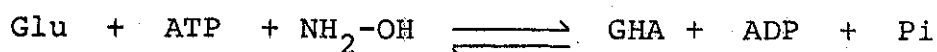
Em fígado de hamster a enzima apresenta um peso molecular de 335 mil e consiste de oito subunidades cada uma com um peso molecular de 42 mil, sendo que a alanina e serina são inibidores não competitivos em relação ao glutamato e é ativada por alfa-cetoglutarato (TIEMIER, 1972a).

Já para cérebro de porco, essa enzima apresenta peso molecular de 370 mil e é constituída por oito subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de 46 mil, sendo que essa GS pode utilizar igualmente os isômeros D e L do glutamato e também o 2-aminoadipato, o 2-amino-3-metilglutamato e o ácido 2-aminopimélico como substratos (STAHL and JAENICK, 1972).

Na regulação do metabolismo da amônia e do glutamato a GS desempenha um papel importantíssimo, pois a interconversão metabólica da Gln em Glu, e vice-versa, está intimamente relacionada com várias reações de transaminações que ocorrem nas células, reações essas importantíssimas para a biossíntese de certos aminoácidos e também como via do catabolismo de amino grupo de aminoácidos. A glutamina é ainda importante principalmente, para animais predominantemente amoneotélicos, como fonte de amônia urinária através de reação catalisada pela GS no sentido de transformação da glutamina em glutamato e amônia.

Pelo menos três métodos tem sido descritos para detectar-se a atividade enzimática da GS. O primeiro é medir-se o fosfato proveniente da quebra do ATP, que somente pode ser aplicado em extratos livres de ATPase ou outras enzimas que utilizam o ATP; o segundo baseia-se na determinação direta da glutamina formada, contudo, o mais importante deles é o terceiro método que tem sido utilizado pela maioria dos autores que tem estudado a atividade da GS, de várias origens, através da formação do gama-glutamilhidroxamato catalisada pela GS a partir da reação entre

ou glutamato ou glutamina com hidroxilamina, segundo as reações abaixo (MEISTER, 1968):



A GS, sendo uma enzima regulatória importante no metabolismo de amônia e sendo largamente distribuída, encontrada em animais, vegetais e microorganismos, decidimos investigar a atividade dessa enzima na regulação do metabolismo de amônia em fígado de anfíbios, visto que, esses animais durante a metamorfose, de um modo geral, passa de uma fase aquática e amoneotética para uma fase terrestre e predominantemente ureotética, sofrendo um número enorme de alterações morfológicas e bioquímicas (COHEN, 1970).

Todavia, apesar de inúmeras tentativas de localizar a glutamina sintetase em fígado ou coração tanto de girinos como de adultos de vários anfíbios como: Bufo paracnemis, Rana catesbeiana e Ambistoma mexicanum, até o presente, não foi possível detectar essa enzima nesses animais através da formação do gama-glutamilhdroxamato. Devido a esse fato, nos propusemos a estudar a GS através da formação do gama-glutamilhdroxamato de vários órgãos de diferentes animais como: cobra, pomba e rato com a finalidade de estudarmos vários aspectos da reação enzimática, podermos avaliar a possibilidade de se conseguir um método mais sensível

que pudesse identificar a glutamina sintetase em anfíbios, bem como investigar se em certos órgãos de outros animais também encontraríamos dificuldades de se detectar a GS através da formação de GHA.

Nesta Tese, estudamos a atividade da GS de fígado, baço, rim e coração de rato; fígado e coração de anfíbios; fígado e coração de pomba e fígado de cobra através da formação do GHA a partir da reação entre a glutamina e hidroxilamina. Determinamos o pH ótimo dessa reação, para GS proveniente de fígado de rato e fígado de pomba, o efeito da concentração de hidroxilamina, o efeito da concentração de arsenato, o efeito de vários íons, particularmente, o efeito da concentração de Mn^{2+} e ainda determinamos os valores de K_M aparente e V_{max} para a glutamina das enzimas estudadas na presença de diferentes concentrações de Mn^{2+} .

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Foram obtidos da firma Sigma Co. (U.S.A.) os seguintes reagentes: glutamina, hidroxilamina, Tris (hidroximetil) aminometano, soroalbumina bovina e brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB). Os demais reagentes usados foram de pureza analítica.

As homogeneizações foram efetuadas em homogeneizador tipo Omni-mixer da Sorvall, modelo 7656 e as centrifugações em centrífuga RC-2B da Sorval refrigerada e as leituras fotocolorimétricas no colorímetro Turner modelo 330.

Os ratos e pombas utilizados neste trabalho foram obtidos em nosso biotério; as cobras (Helicops modestus) foram coletadas em uma lagoa situada na área da UNICAMP; os anfíbios usados foram : Rana catesbeiana, criada no município de Jundiaí, São Paulo; Bufo paracnemis, coletadas no município de Itapira, São Paulo e Ambistoma mexicanum, da cidade de Xoximilco, México.

2.2. Métodos

2.2.1. Dosagem de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de LOWRY et al. (1951) utilizando-se soro albumina bovina

como padrão.

2.2.2. Preparação do extrato bruto (EB)

No caso dos anfíbios, os fígados e corações eram obtidos após desmedulação dos animais; no caso de fígado e coração de pomba, de fígado de cobra e de fígado, baço e rim de rato, os órgãos eram obtidos após decapitação dos animais. Os órgãos retirados dos animais foram colocados imediatamente em solução de cloreto de sódio 0,155 M pH 7,0, ajustado com Tris, e em seguida foram picados e lavados com a solução de cloreto de sódio, até se conseguir uma solução de lavagem praticamente sem hemáceas. Após esse processo os órgãos picados foram homogeneizados com solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0.1%, na proporção de 3ml de solução para cada grama de órgão, no omni-mixer durante 1 minuto, em rotação máxima (aproximadamente 16000 rpm), a temperatura em todo o processo foi mantida entre 0 - 4°C. Após a homogeneização, a suspensão obtida foi submetida a uma centrifugação a 12100x g/10 minutos/0°C, após o que o precipitado foi descartado e o sobrenadante passava a ser o extrato bruto (EB) e se usado imediatamente mantinha-se a 0 - 4°C ou então armazenava-se a - 15°C, contudo a maioria dos EB por nós obtidos, não conservavam por muito tempo a atividade enzimática da GS, mesmo conservados à temperatura de -15°C.

2.2.3. Determinação da atividade enzimática

O método utilizado em nosso trabalho está baseado no descrito por SHAPIRO E STADTMAN (1970), com modificações introduzidas nessa tese, através da formação do gama-glutamilhdroxamato (GHA) mais amônia, a partir da reação entre glutamina e hidroxilamina, catalisada pela GS como uma transferase, substituindo o grupamento $-NH_2$ amida da glutamina pelo radical $-NH-OH$.

Nas reações gerais, as concentrações finais dos reagentes foram as seguintes: Gln 75mM; arsenato de sódio 50mM; hidroxilamina 40mM; cloreto de manganês 50mM; o tampão utilizado foi Tris 0.1M pH 7.5, ajustado com âcido acético. Cada um dos reagentes foram preparados em solução-estoque individual em uma concentração apropriada para que quando adicionados no meio de reação pudéssemos obter as concentrações finais acima expressas. Na mistura dos reagentes, é muito importante observar a seguinte ordem de adições: Gln, Asi, HA e $MnCl_2$, visto que, alterando essa ordem obtínhamos atividade enzimática nula. O volume final da incubação enzimática foi de 1,0ml. A reação foi iniciada pela adição de EB a ser estudado, numa solução dos reagentes acima mencionados; após incubação a 37°C por 10 minutos, interrompia-se a reação pela adição de 0.5 ml de uma solução de TCA 4% - $FeCl_3$ 3,2% em HCl 0,5N.

Após o encerramento das reações, os precipitados foram descartados por centrifugação em uma centrífuga Eppendorf, a 13000 rpm/2 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante (1,5 ml) foi diluído em igual voluu

me de água destilada. A quantidade de GHA produzida durante a reação foi determinada pela intensidade de coloração formada pelo GHA na presença de Fe^{+3} em meio ácido, medida pela absorção de luz de comprimento de onda igual a 500 nm ($A_{500\text{nm}}$).

2.2.4. Definição de unidade de GS

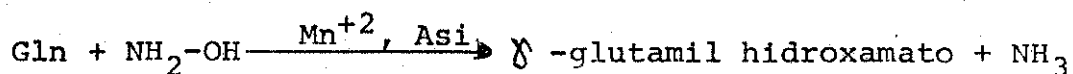
Expressamos neste trabalho por 1 U.A. (unidade absoluta arbitrária) cada milésimo de $A_{500\text{nm}}$ correspondente ao GHA produzido em 10 minutos de reação a 37°C .

A atividade específica (A.E.) corresponde ao número de U.A./mg de proteína do EB que contém a enzima estudada.

III. RESULTADOS

3.1. Efeito do ADP sobre a atividade da GS

Nesta tese determinamos a atividade enzimática da GS, exclusivamente, através da reação:



Vários autores utilizam esta reação em estudos sobre GS, usando o ADP como co-fator necessário para a reação. Entretanto pudemos demonstrar que o ADP é absolutamente dispensável na reação catalisada pela GS de fígado, baço e rim de rato, de fígado e coração de pomba, e de fígado de cobra, visto que, encontramos, particularmente a mesma atividade específica para cada enzima estudada, na ausência ou presença de ADP 0.8mM (Tabela 1).

3.2. Efeito do pH

Glutamina sintetase de fígados de rato e pomba apresentam um pH ótimo entre 7,0 e 7,5. No pH 6,0 a atividade enzimática é praticamente reduzida a 50% em relação a encontrada no pH ótimo. Em pH abaixo de 4,5 a atividade é praticamente nula (Figura 1)

3.3. Efeito de diferentes íons divalentes sobre a atividade da GS

A formação do gama-glutamil hidroxamato ca

TABELA 1. Efeito do ADP sobre a formação do GHA catalisada pela GS de fígado, baço e rim de rato; fígado e coração de pomba, e fígado de cobra.

Órgão (1)	Atividade específica (2)	
	sem ADP	com ADP 0,8 mM
Fr	483 (± 24)	497 (± 26)
Br	398 (± 23)	389 (± 27)
Rr	216 (± 11)	222 (± 13)
Fp	472 (± 24)	487 (± 24)
Cp	455 (± 19)	448 (± 25)
Fc	738 (± 36)	719 (± 39)

- (1) Fr, Br e Rr representam GS de fígado, baço e rim de rato respectivamente; Fp e Cp representam a de fígado e coração de pomba; Fc a de fígado de cobra.
- (2) Atividade específica representa o número de unidades arbitrárias da reação enzimática por mg de proteínas do EB. Em cada ensaio as concentrações finais dos reagentes foram: Gln 75mM; Asi 50mM; HA 40mM; $MnCl_2$ 50mM e tampão Tris-acetato 0,1M pH 7,5 (Outros detalhes ver em Materiais e Métodos).

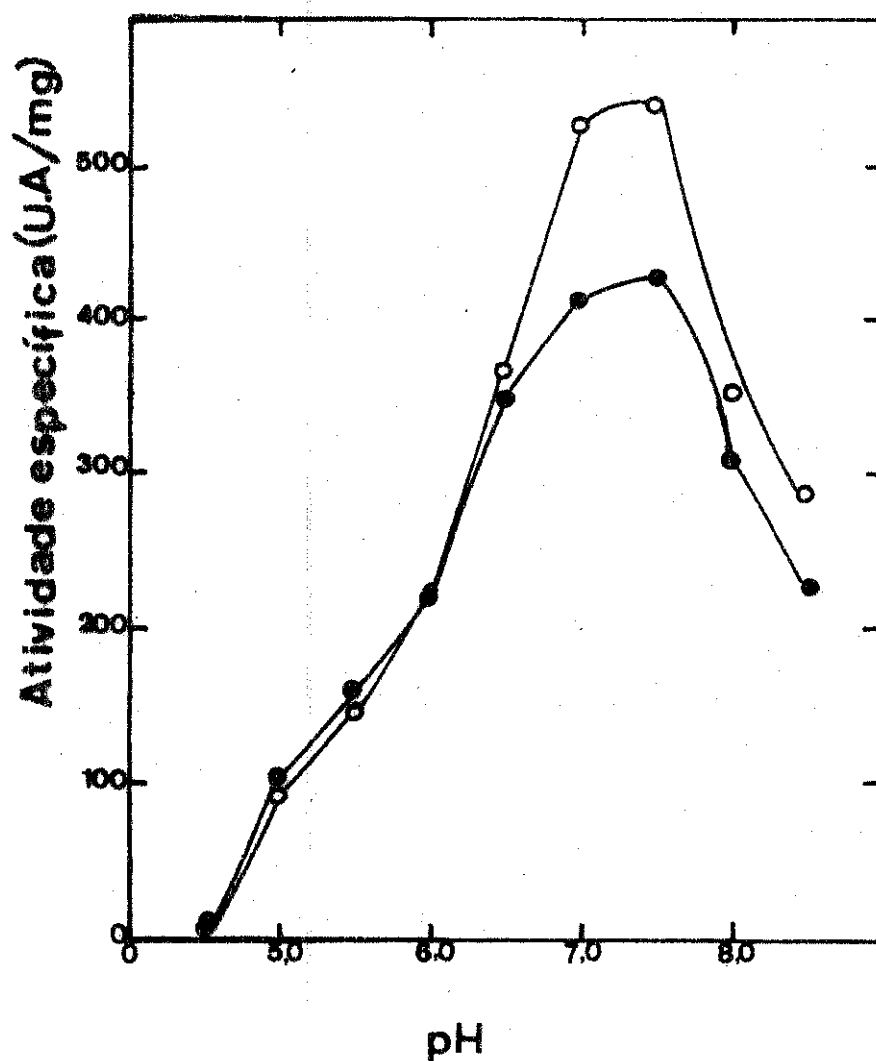


FIGURA 1 - Efeito do pH sobre a GS de fígado de pombo (●—●) e de fígado de rato (○—○). As concentrações finais dos reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; HA 40 mM; $MnCl_2$ 50 mM, o tampão utilizado foi acetato-ácido acético 0,1 M para os pHs 4,0 a 5,0; para os pHs 5,5 a 7,0 foi o tampão imidazol 0,1 M e para os pHs acima de 7,0 utilizamos tampão Tris-acetato 0,1 M.

talizada por GS de fígado, baço e rim de rato é absolutamente dependente do íon Mn^{+2} e este não pode ser substituído por outros íons divalentes como: Mg^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} e Ca^{+2} (Tabela 2)

TABELA 2. Efeito de cátions divalentes sobre a atividade da GS de fígado, baço e rim de rato.

Cátion divalente	Atividade específica (1)		
	fígado	baço	rim
Mn^{2+} 0mM	0	0	0
Mn^{2+} 5mM	220	172	86
Mn^{2+} 50mM	580	320	158
Mg^{2+} 5mM	0	0	0
Mg^{2+} 50mM	0	0	0
Co^{2+} 5mM	0	0	0
Co^{2+} 50mM	0	0	0
Fe^{2+} 5mM	0	0	0
Fe^{2+} 50mM	0	0	0
Ca^{2+} 5mM	0	0	0
Ca^{2+} 50mM	0	0	0

(1) Atividade específica representa o número de unidades arbitrárias da reação por mg de proteínas do EB (ver Materiais e Métodos). Em cada ensaio as concentrações finais dos reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50mM; HA 40mM; $MnCl_2$ 50mM e tampão Tris acetato 0,1M pH 7,5.

3.4. Efeito da variação da concentração de Mn^{+2} sobre a atividade da GS

Pudemos demonstrar para todas as glutamina sintetases dos diferentes órgãos de animais, por nós estudados, que as enzimas são sensíveis à quantidade total de

Mn^{+2} existente no meio de reação. Verificamos que na ausência do íon, a reação enzimática não ocorre e na presença de concentrações de Mn^{+2} desde 0,1mM até 50mM a reação é estimulada; embora concentrações de Mn^{+2} a partir de 10 mM causassem a formação de um precipitado provavelmente de arsenato de manganês. Demonstramos ainda que concentrações de Mn^{+2} superiores a 50mM causavam uma acentuada inibição da reação enzimática.

Devido à formação do precipitado acima referido, todas as nossas indicações de concentração de íon Mn^{+2} a partir de 10mM não expressa necessariamente a quantidade real de Mn^{+2} solúvel, mas sim a quantidade total do íon existente no meio de reação

Assim, GS de fígado de rato apresenta um aumento de cerca de três vezes quando na presença de Mn^{+2} 50 mM em relação a atividade da enzima na presença de Mn^{+2} 1mM (Figura 2). Para GS de baço (Figura 3-A) e de rim (Figura 3-B) de rato observamos um fato semelhante ao observado com GS de fígado de rato. Da mesma forma pudemos demonstrar efeito análogo de concentrações de Mn^{+2} sobre a atividade de GS de fígado de cobra (Figura 4) e de fígado (Figura 5-A) e coração (Figura 5-B) de pomba.

3,5. Efeito da concentração de arsenato (Asi) sobre a atividade da GS

Estudamos o efeito da concentração do Asi, sobre a atividade específica da GS de fígado, baço e rim de rato e verificamos que o Asi é indispensável para a rea

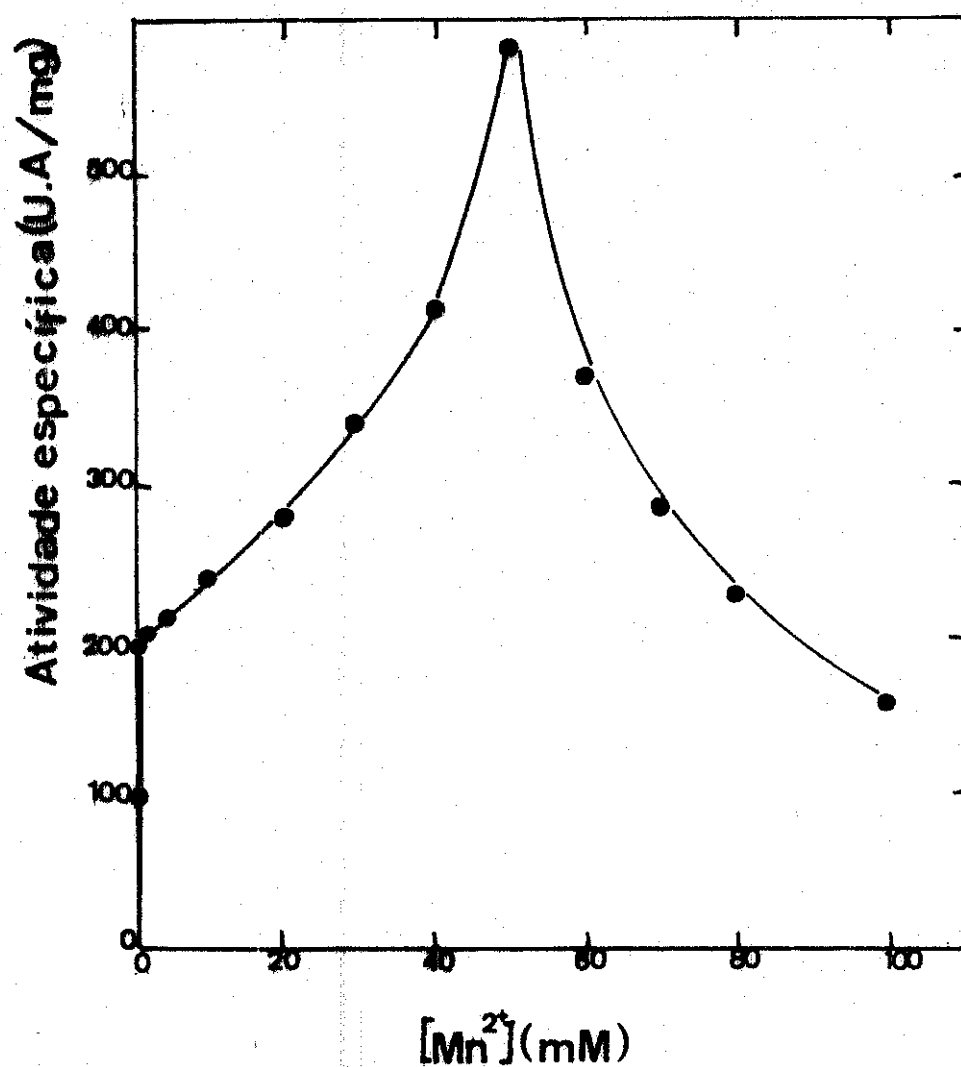


FIGURA 2 - Efeito da concentração de $MnCl_2$ sobre a atividade específica da GS de fígado de rato. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; HA 40 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

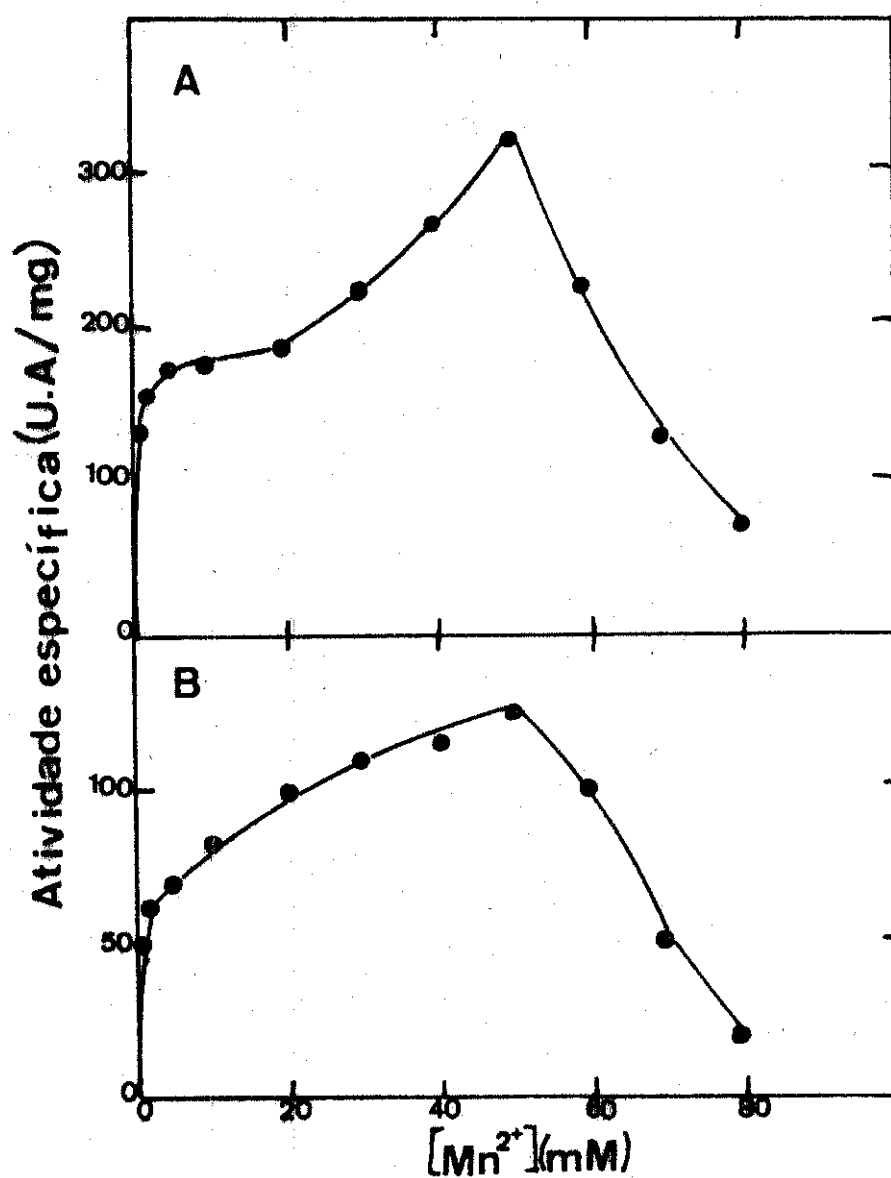


FIGURA 3 - Efeito da concentração de $MnCl_2$ sobre a atividade específica da GS de baço (A) e rim (B) de rato. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; HA 40 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

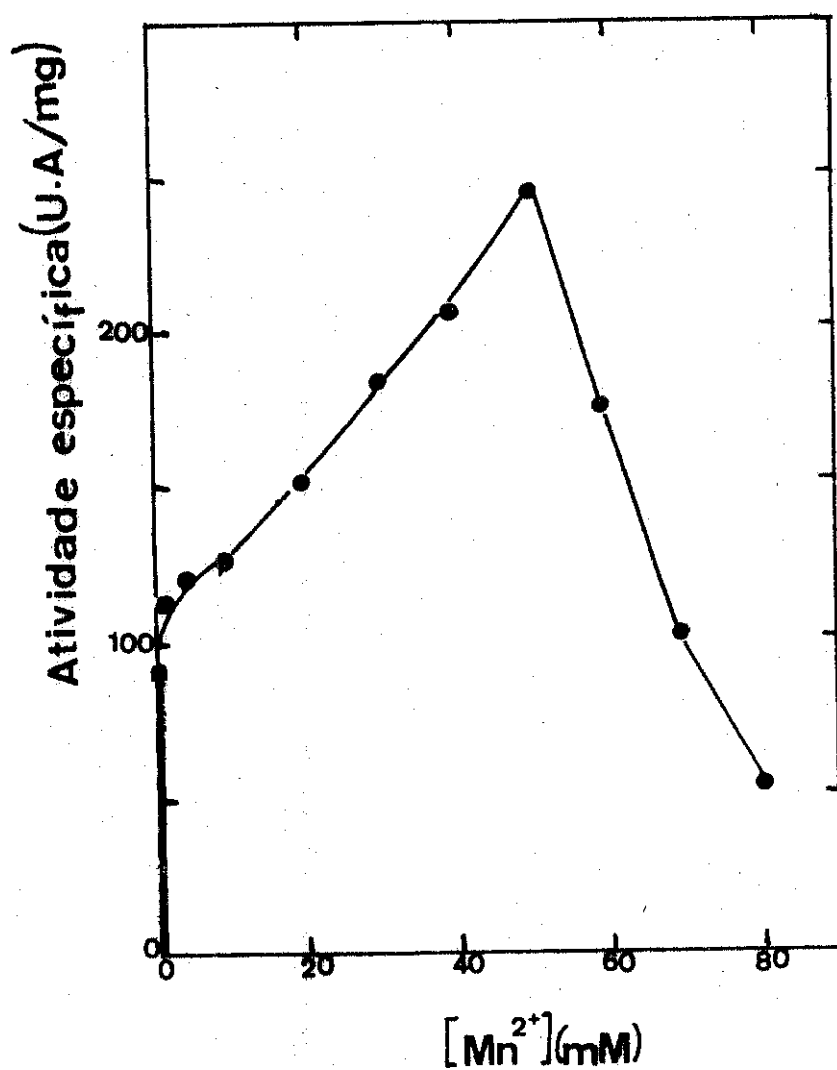


FIGURA 4 - Efeito da concentração de $MnCl_2$ sobre a atividade específica da GS de fígado de cobra. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; HA 40 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

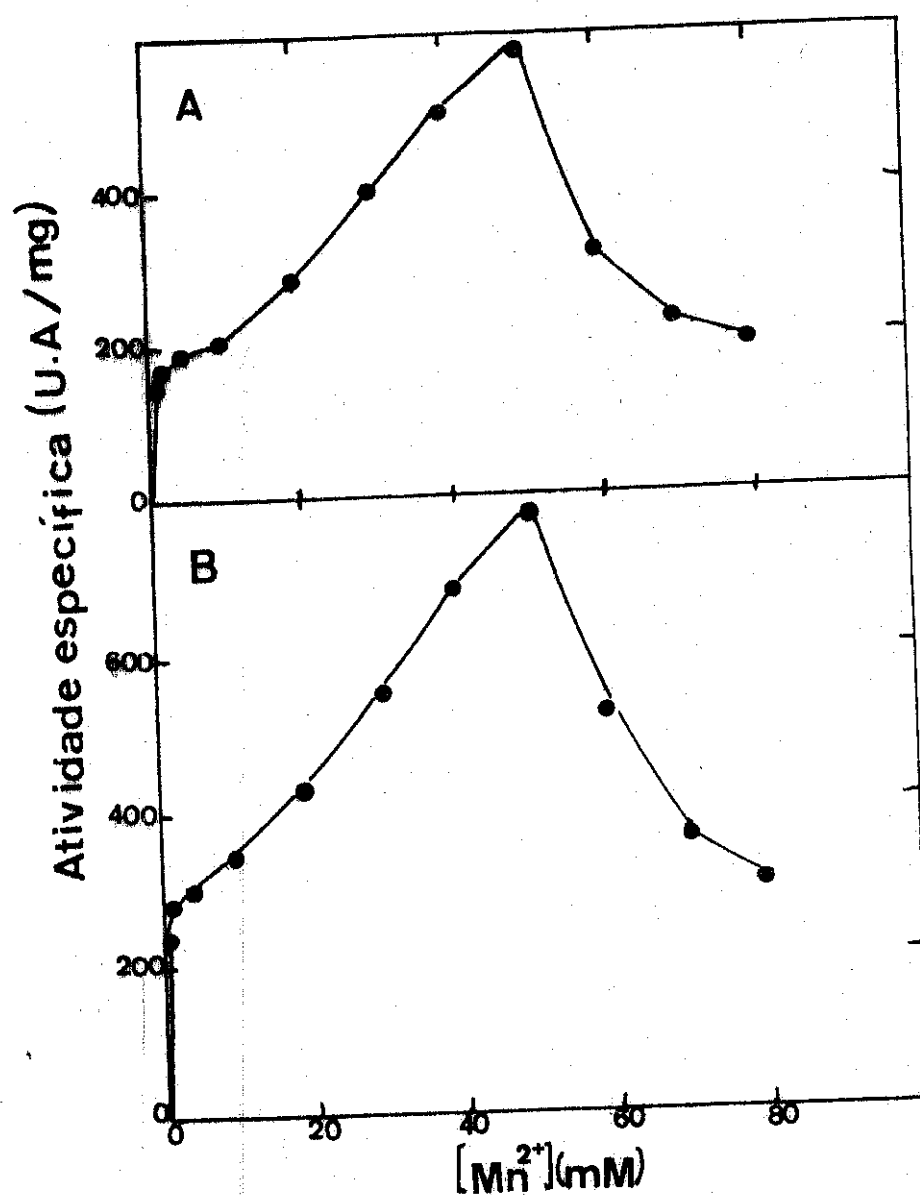


FIGURA 5 - Efeito da concentração de $MnCl_2$ sobre a atividade específica da GS de fígado (A) e coração (B) de pombo. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; HA 40 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

ção enzimática, pois quando não temos o mesmo meio de reação a atividade específica da GS é nula. Quando aumentamos a concentração de Asi temos aumento gradativo da atividade enzimática, até 40mM, concentrações superiores a 40mM provoca idênticos estímulos à reação (Figura 6).

3.6. Efeito da concentração da hidroxilamina (HA) sobre a atividade da GS

Investigando-se o efeito da concentração da HA sobre a atividade específica da GS de fígado (Figura 7), rim (Figura 8-A) e baço (Figura 8-B) de rato, pudemos demonstrar que aumentando-se a concentração de HA, gradativamente, verifica-se também um aumento gradual da atividade enzimática, sendo que a concentração é de 40mM para todos os órgãos de rato estudados e concentrações superiores a esse valor, causaram uma parcial inibição da enzima (Figuras 7 e 8).

3.7. Efeito da concentração da Gln sobre a atividade enzimática da GS na presença de diferentes concentrações de Mn^{2+} . Determinação do K_m e V_{max} das reações

Estudamos o efeito da variação da velocidade de enzimática, causada pela variação da concentração de Gln em diferentes concentrações de Mn^{2+} . Determinamos a atividade específica da GS de fígado (Figura 9-A); baço (Figura 9-B) e de rim (Figura 9-C) de rato e observamos que aumentando a concentração de Gln ocorre um aumento da atividade enzimática, à vezes, como notamos para fígado

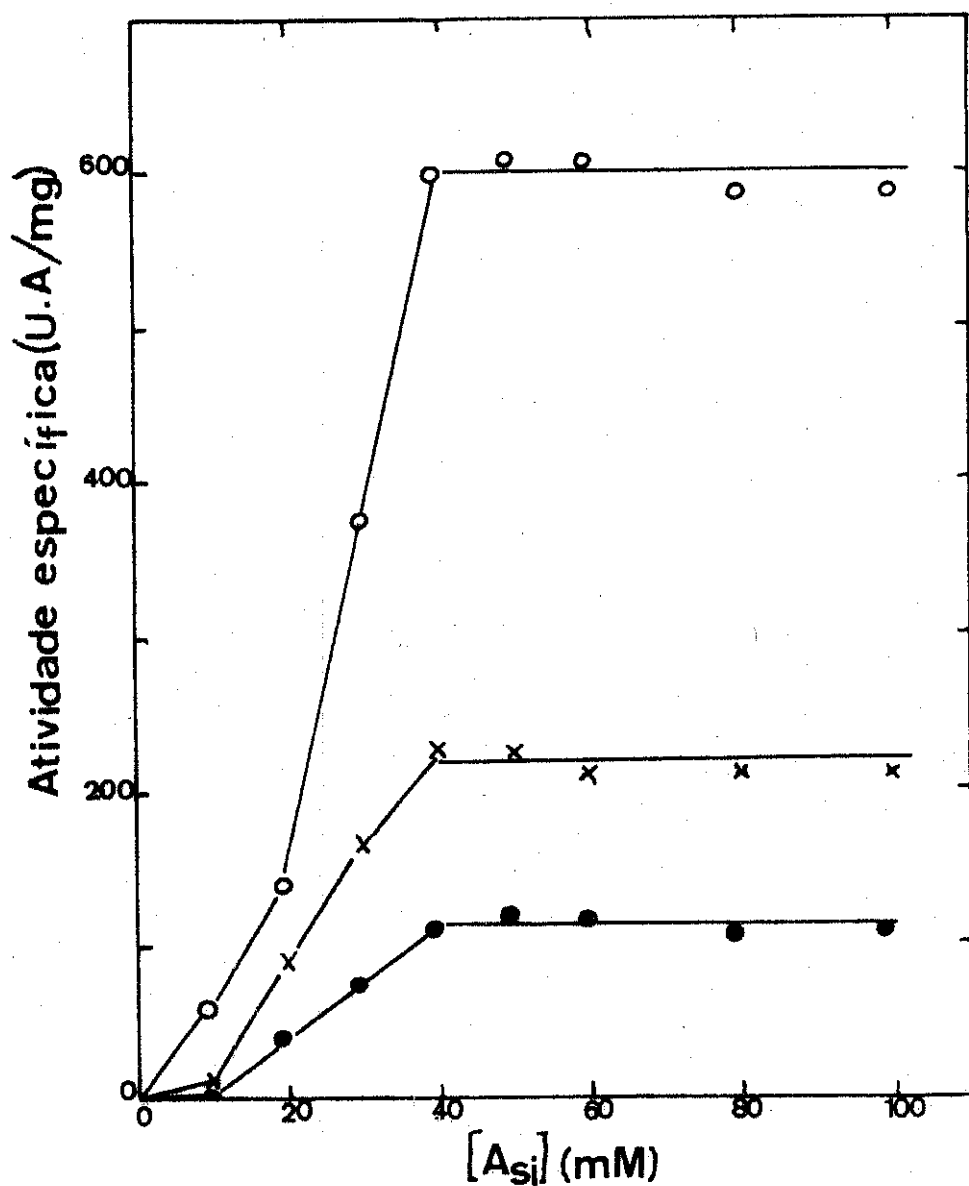


FIGURA 6 - Efeito da concentração de Asi sôbre a atividade específica da GS de fígado (o — o); baço (x — x) e rim (• — •) de rato. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; HA 40 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

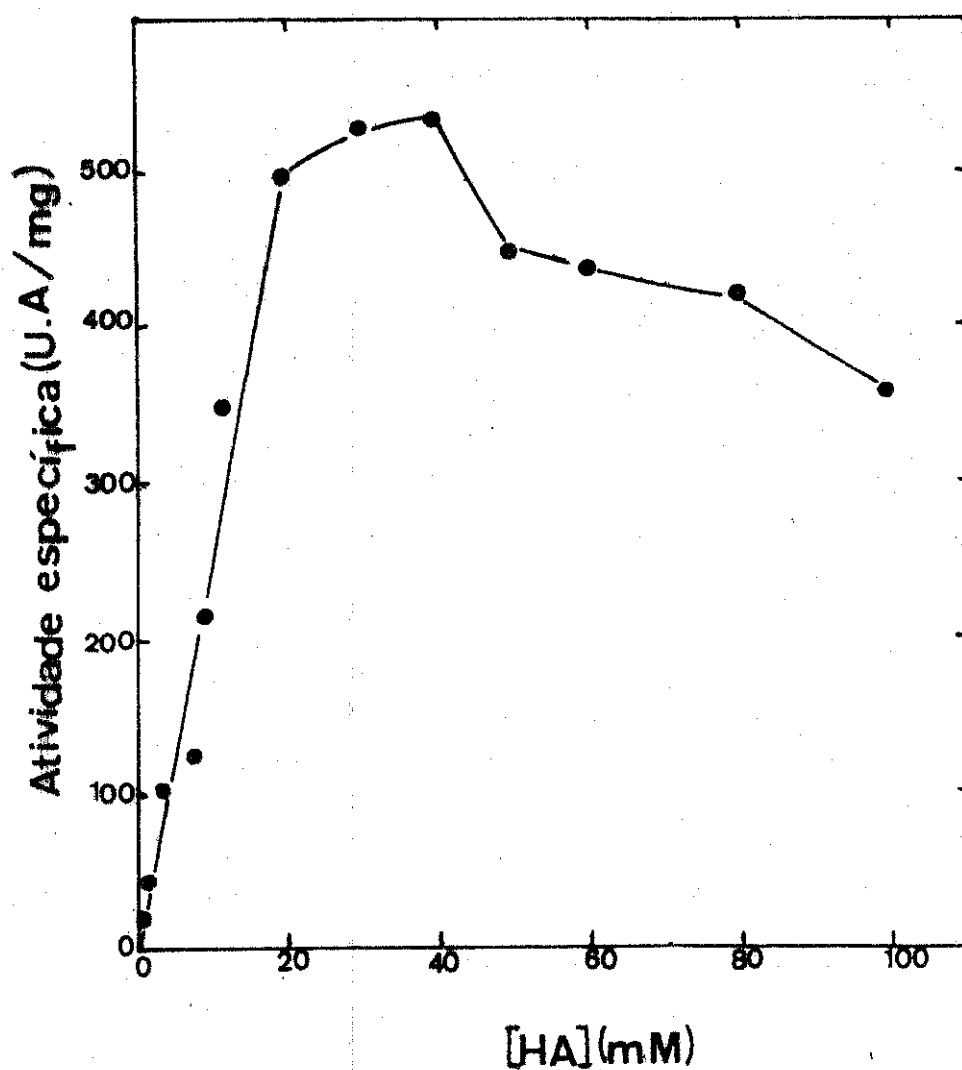


FIGURA 7 - Efeito da concentração de HA sobre a atividade específica de GS de fígado de rato. As concentrações finais dos outros reagentes foram Gln 75 mM; Asi 50 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

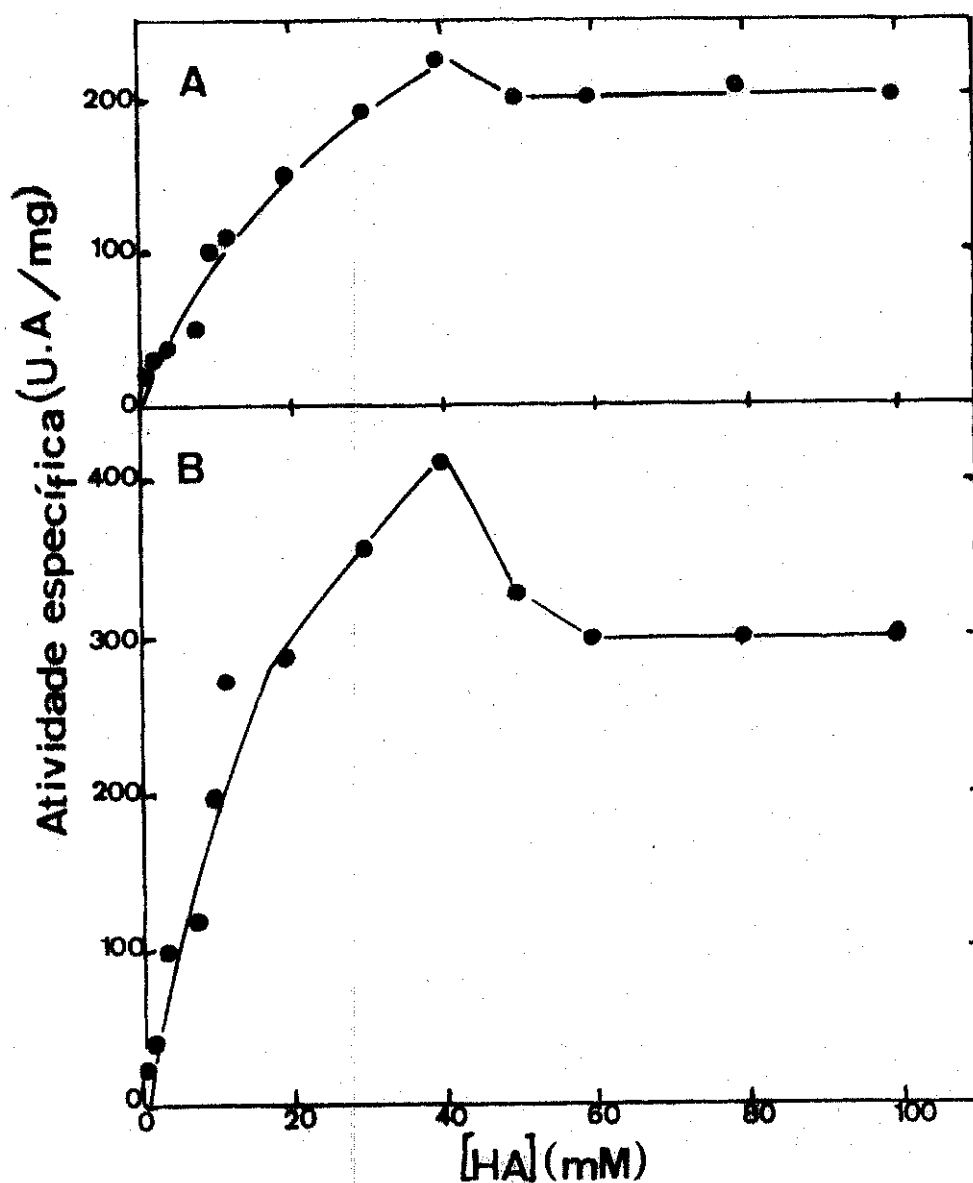


FIGURA 8 - Efeito da concentração de HA sobre a atividade específica da GS de rim (A) e de baço (B) de rato. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Gln 75 mM; Asi 50 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

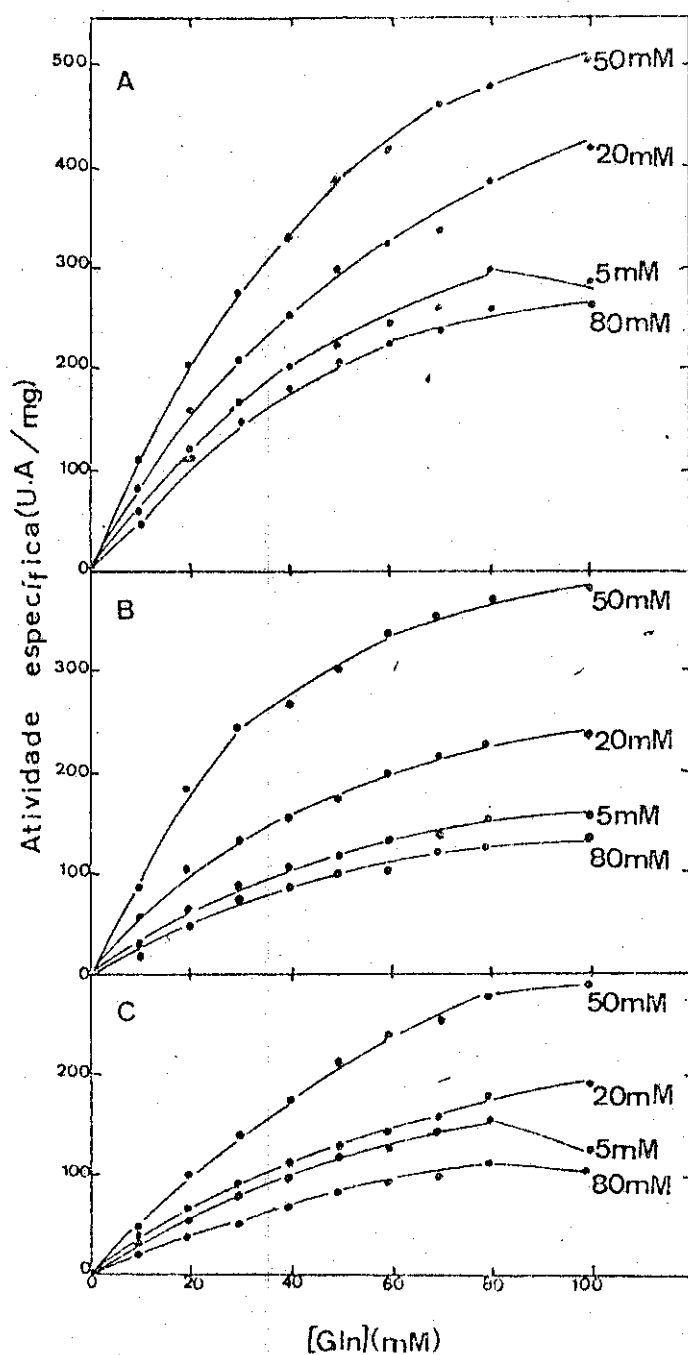


FIGURA 9 - Efeito da concentração da Gln sôbre a atividade específica da GS de fígado (A),baço(B) e rim (C) de rato na presença de diferentes concentrações de $MnCl_2$, como indicadas na figura. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Asi 50 mM; HA 40 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

(Figura 9-A) e rim (Figura 9-C) de rato , concentrações superiores a 80mM de Gln causam inibição da atividade enzimática. A partir dos resultados obtidos na Figura 9 calculamos através da equação de Lineaweaver-Burk, os valores de Km e Vmax para fígado (Figura 10-A); baço (Figura 10-B) e rim (Figura 10-C) de rato cujos valores estão expostos na Tabela 3.

Na Figura 11 demonstramos o efeito da concentração de Gln em diferentes concentrações de Mn^{2+} para coração e fígado de pomba, observamos que concentração superior a 80mM de Gln em concentração de 5mM de Mn^{+2} ocorre diminuição da atividade enzimática. A partir dos resultados obtidos na Figura 11 calculamos através da equação de Lineaweaver-Burk os valores de Km e Vmax para GS de coração (Figura 12-A) e fígado (Figura 12-B) de pomba cujos valores estão expostos na Tabela 3.

Por outro lado, na Figura 13, de maneira semelhante, estudamos efeito análogo, para fígado de cobra e da mesma maneira a partir dos dados obtidos, calculamos através da equação de Lineaweaver-Burk os valores de Km e Vmax para GS de fígado de cobra (Figura 14) cujo valor está exposto na Tabela 3.

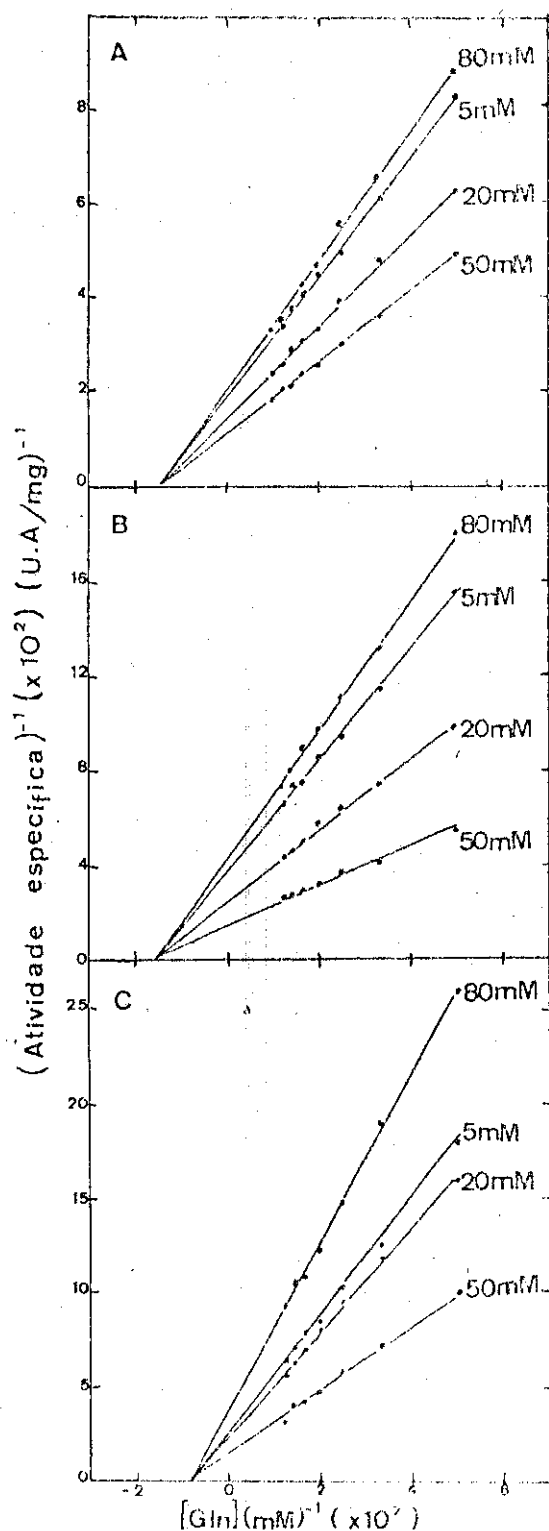


FIGURA 10 - Dupla-recíproca da variação da atividade específica da GS de fígado (A), baço (B) e rim (C) de rato, em função da variação da Gln, na presença de diferentes concentrações de MnCl_2 , como indicadas na figura. As retas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados a partir dos pontos experimentais mostrados na Figura 9.

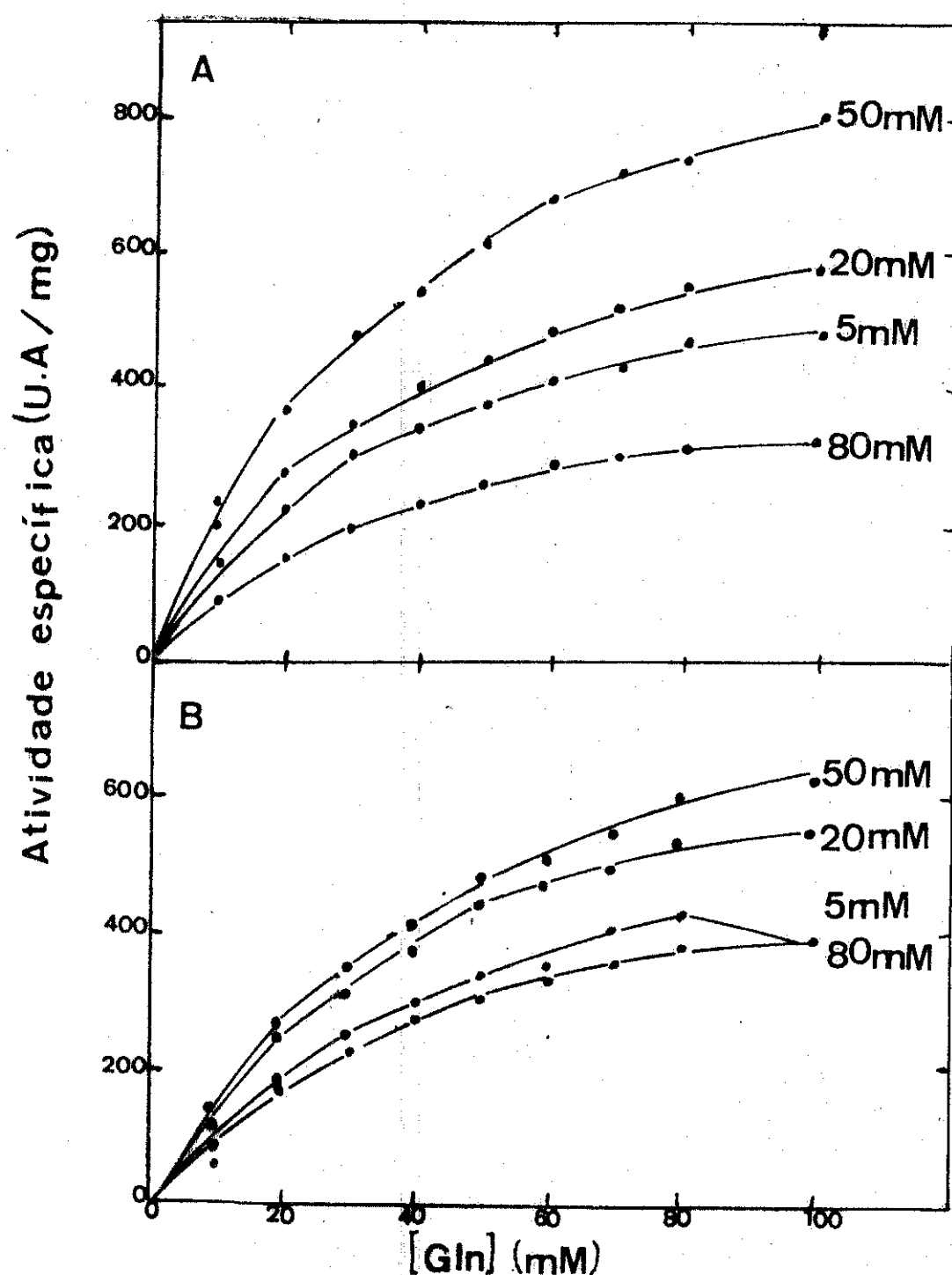


FIGURA 11 - Efeito da concentração da Gln sobre a atividade específica da GS de coração (A) e fígado (B) de pomba, na presença de diferentes concentrações de $MnCl_2$, como indicado na figura. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Asi 50 mM; HA 40 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

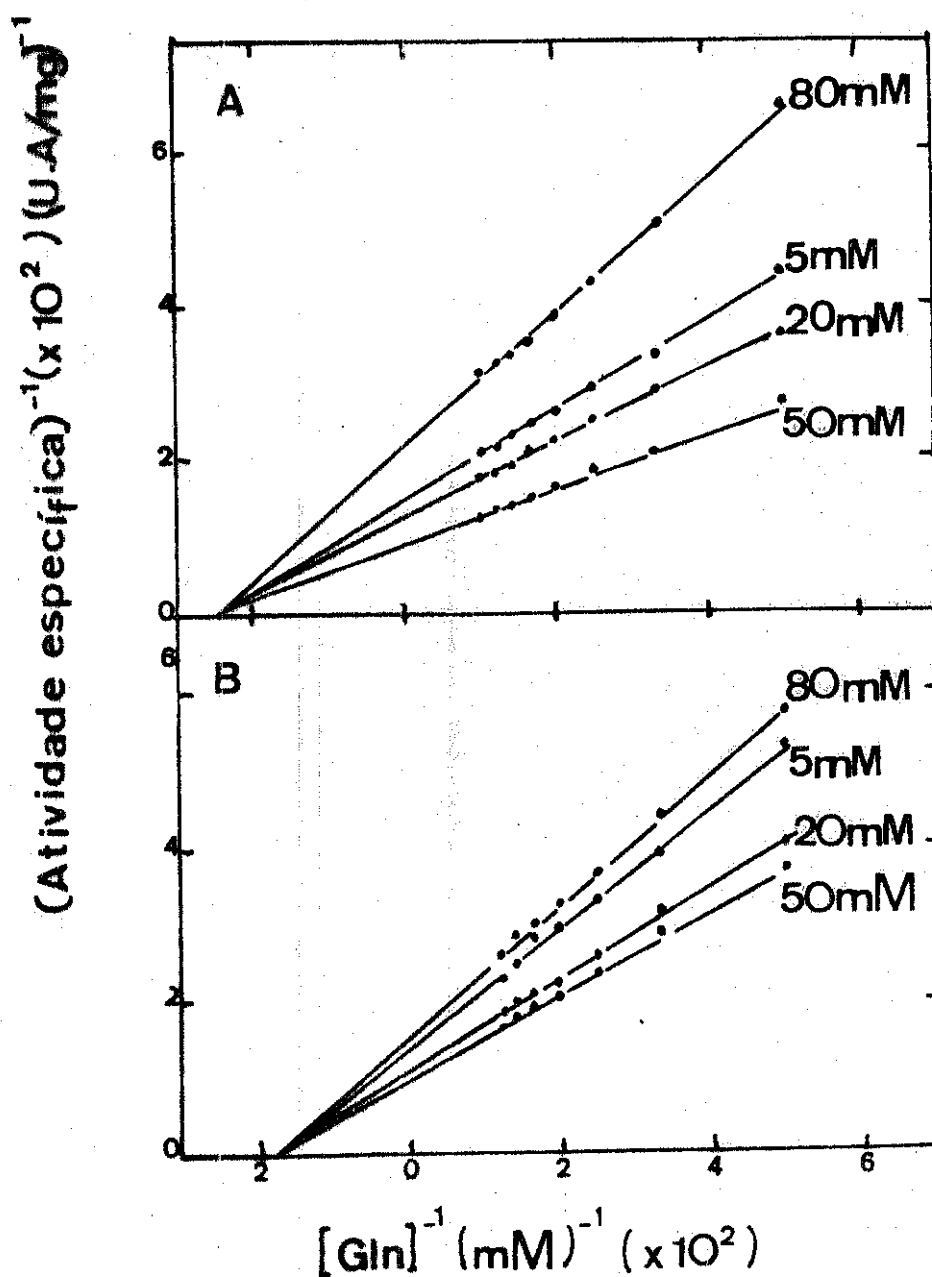


FIGURA 12 - Dupla-recíproca da variação da atividade específica da GS de coração (A) e fígado (B) de pombo, em função da variação da Gln, na presença de diferentes concentrações de MnCl_2 , como indicados nas figuras. As retas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados a partir dos pontos experimentais mostrados na Figura 11.

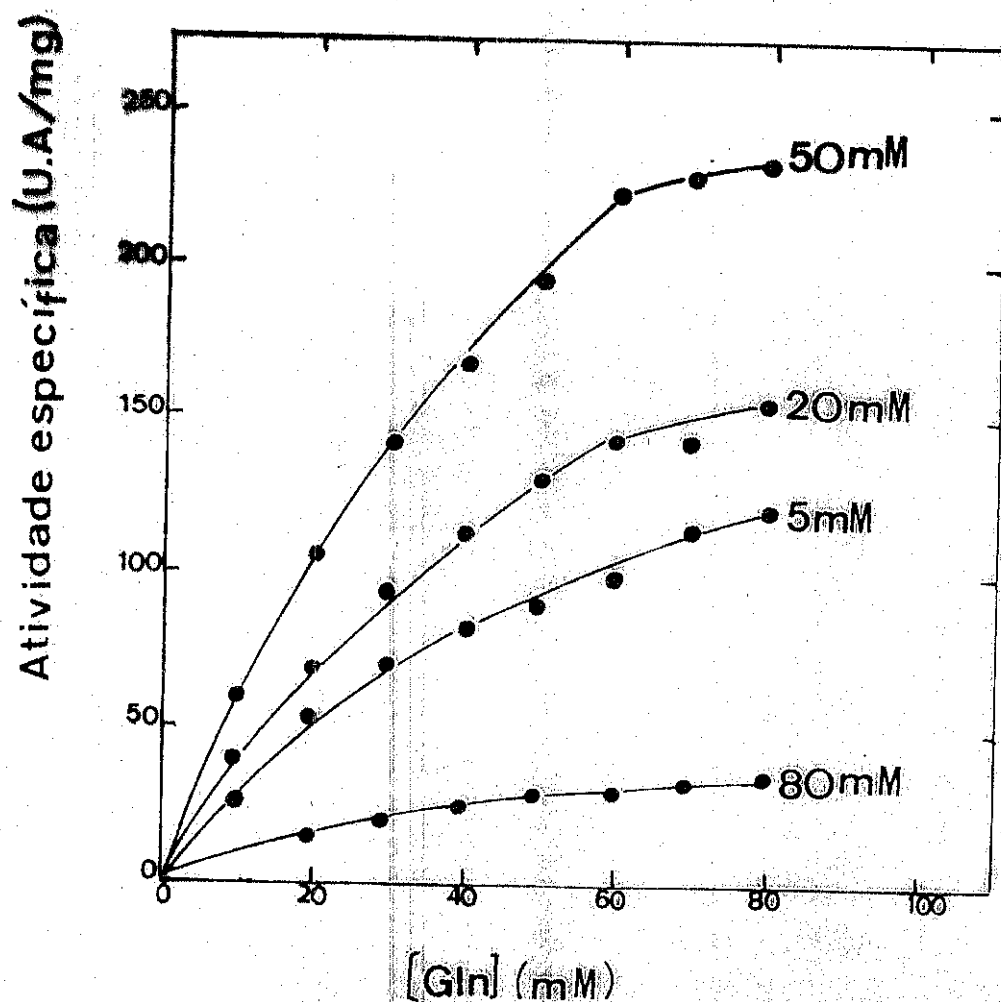


FIGURA 13 - Efeito da concentração da Gln sobre a atividade específica da GS de fígado de cobra, na presença de diferentes concentrações de $MnCl_2$, como indicados na figura. As concentrações finais dos outros reagentes foram: Asi 50 mM; HA 40 mM; $MnCl_2$ 50 mM e tampão Tris-acetato pH 7,5.

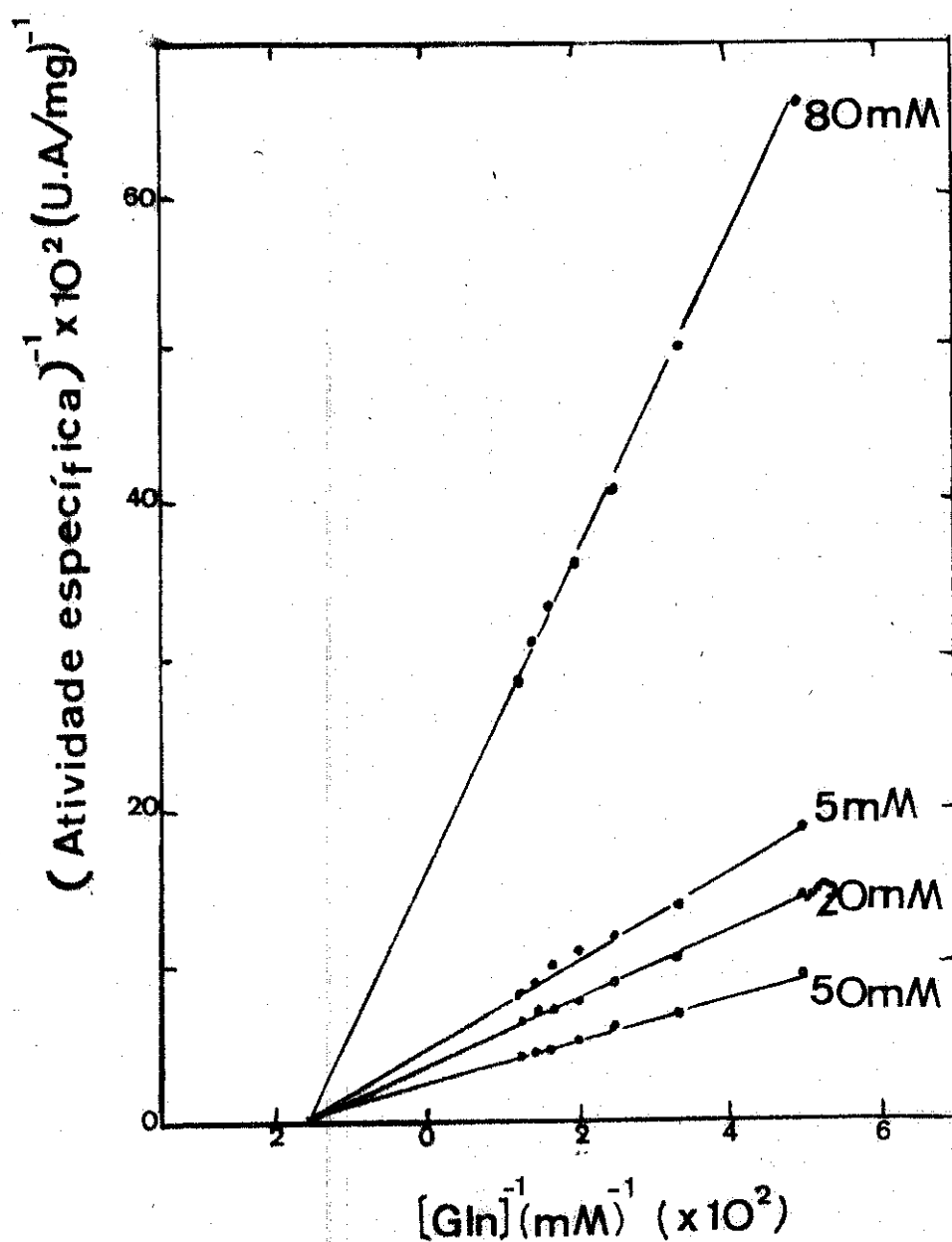


FIGURA 14 - Dupla recíproca da variação da atividade específica da GS de fígado de cobra, em função da variação da concentração da Gln, na presença de diferentes concentrações de MnCl_2 , como indicados na figura.13. As retas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados a partir dos pontos experimentais mostrados na figura 13.

TABELA 3. Valores de Km aparente e Vmax para Gln de GS de várias origens na presença de diferentes concentrações de Mn^{2+} .

GS (1)	Km (2) nas $[Mn^{2+}]$:			Vmax (3) nas $[Mn^{2+}]$:				
	5mM	20mM	50mM	80mM	5mM	20mM	50mM	80mM
FC	64,5	62,9	64,9	65,8	220,7	284,1	429,5	64,1
Fp	56,2	55,3	56,5	56,2	729,9	900,9	1030,9	561,8
Cp	40,3	38,5	40,0	40,5	714,3	800,0	1136,4	471,7
Fr	65,8	67,1	69,0	68,0	520,9	689,7	909,1	487,9
Br	63,3	64,5	62,5	66,7	266,7	396,8	571,4	240,4
Rr	120,5	121,7	120,5	119,0	400,0	434,8	704,2	268,1

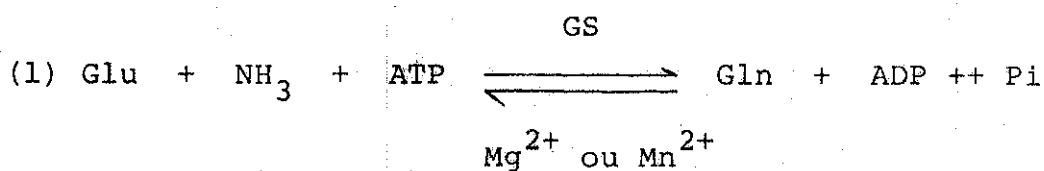
(1) GS proveniente de fígado de cobra (Fc); fígado de pomba (Fp); coração de pomba (Cp); fígado de rato (Fr); baço de rato (Br); rim de rato (Rr).

(2) Os valores de Km estão expressos como $[Gln]$ (mM).

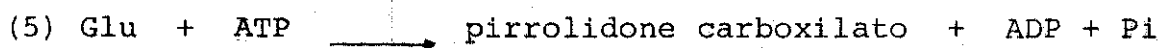
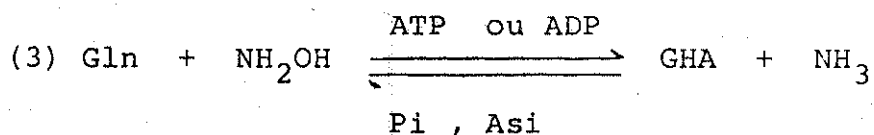
(3) Os valores de Vmax estão expressos como número de U.A./mg de proteína/10 minutos de reação.

IV. DISCUSSÃO.

A glutamina sintetase catalisa a seguinte reação metabólica reversível:



Além desta reação clássica a GS pode apresentar outras atividades catalíticas estas incluem a formação do gama-glutamil-hidroxamato quando amônia é substituída por hidroxilamina (reações 2 e 3); a arsenólise da glutamina (reação 4) e a formação de pirrolidone-carboxilato (reação 5):

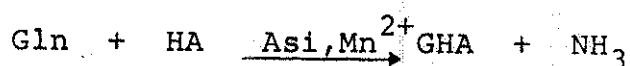


Segundo MEISTER (1968) os nucleotídeos são requeridos para todas as reações catalisadas pela GS, o requerimento para nucleotídeos é estequiométrico para as reações 1, 2 e 5, mas somente pequenas quantidades de nucleotídeos são ne-

cessários para as outras reações. Para GS de E. coli, tanto o ATP como o ADP na concentração de $2,5 \times 10^{-7}$ M produz uma ativação da atividade enzimática (WELLNER and MEISTER, 1966) e foram encontrados valores do K_M aparente da enzima para ADP e ATP como sendo respectivamente $4,0 \times 10^{-5}$ e $3,6 \times 10^{-4}$ M (WOOLFOLK et al., 1966).

No entanto demonstramos que para as glutaminas e sintetases extraídas de fígado, baço e rim de rato; fígado e coração de pomba e fígado de cobra a presença do ADP é absolutamente dispensável, assim todos os ensaios mostrados nesse trabalho foram realizados na ausência desse nucleotídeo. Esse resultado pode sugerir que a GS de origem animal tenha um comportamento diferente em relação a de microorganismos, quanto a dependência de ADP na reação enzimática.

Neste trabalho detectamos a atividade de todas as glutaminas sintetases por nós estudadas através da formação de GHA a partir da Gln e HA na presença de Mn^{2+} e Asi como esquematizado abaixo:



Encontramos para essa reação um pH ótimo em torno de 7,5, determinado para GS de fígado de rato e fígado de rato e fígado de pomba. Esse valor é comparável com os já descritos para GS de outras origens, como a de fígado de hamster cujo pH ótimo está entre 7,3 a 7,8 (TIEMEIER e MILMAN, 1972a) e para a de E. coli cujo pH ótimo está entre 7,3 a 7,7 (WOOLFOLK et al., 1966).

A reação enzimática, por nós estudada, catalisada pela GS é absolutamente dependente de Mn^{+2} . Outros ions divalentes como: Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} não substituem o Mn^{+2} , no entanto, com microorganismos foi demonstrado que o Mn^{+2} pode ser substituído por alguns outros ions divalentes, embora sejam menos eficientes. Dessa forma para GS de Bacillus subtilis o Mn^{+2} pode ser substituído pelos seguintes ions em ordem decrescente de ativação: Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} (Deuel and Stadtman, 1970). Nesse sentido procuramos determinar qual seria a concentração ótima de Mn^{+2} como ativador da reação enzimática. Para todas as GS estudadas demonstramos que a concentração de 50 mM é a que mais estimula a enzima, e concentrações superiores a essa causam uma acentuada inibição, entretanto, concentrações de Mn^{+2} acima de 10 mM presentes no ensaio de reação provocam o aparecimento de um precipitado, provavelmente de arsenato de manganês, que não interfere, aparentemente, na reação, visto que demonstramos que na presença de Mn^{+2} 50 mM a atividade é cerca de três vezes maior do que na presença de 10 mM. Dessa forma todas as concentrações de Mn^{+2} a partir de 10 mM não expressa necessariamente a quantidade real de Mn^{+2} solúvel, mas sim a quantidade do ion existente no meio de reação.

Baseando nesses resultados utilizamos nos ensaios para determinar atividade da GS a concentração de 50 mM e verificamos que se usássemos concentrações abaixo de 10 mM, GS de certos órgãos como do rim e baço de rato

que possuem menores quantidades de enzima apresentariam uma atividade muito baixa e em alguns casos poderia passar despercebida.

Estudando atividade da GS para fígado, baço e rim de rato demonstramos que o arsenato e hidroxilamina são também requeridos para a reação, no entanto observamos que o aumento da concentração de Asi até 40 mM causam um aumento da atividade enzimática e concentrações acima dessa até 100 mM (não foram estudadas concentrações superiores) causam idênticos efeitos sobre a atividade enzimática igual ao causado pelo Asi 40 mM. Por outro lado o aumento da concentração de HA até 40 mM causam aumento da atividade enzimática, porém concentrações acima desta causam uma parcial inibição.

Shapiro e Stadtman (1970) determinam a atividade de GS de E. coli utilizando as seguintes concentrações dos reagentes, para a formação do GHA: ADP 0,8 mM, Gln 60 mM, arsenato de potássio 40 mM, hidroxilamina 125 mM e $MnCl_2$ 6 mM. Nesta Tese estabelecemos que as melhores concentrações dos reagentes, para a mesma reação e dispensando-se o ADP por razões já expostas, são as seguintes: Gln 75 mM, Asi 50 mM, HA 40 mM e $MnCl_2$ 50 mM. Dessa forma, pelo menos, para as GS dos animais estudados, as concentrações dos reagentes proposta por aqueles autores implicaria numa determinação da atividade enzimática, no mínimo, três vezes menos do que se realizadas nas condições por nos propostas. Todavia, mesmo realizando ensaios para determinar a atividade de GS de coração e fígado de anfíbios como: Bu-

fo paracnemis, Rana catesbeiana (girinos e adultos) e Ambistoma mexicanum nas nossas condições, foi impossível detectar a atividade da enzima nesses animais. Do mesmo modo também não conseguimos detectar GS em coração de rato.

Contudo não estamos ainda convencidos de que não existiria GS nesses animais, visto que a mesma é amplamente distribuída, sendo encontrada em vegetais, microorganismos e animais. Uma das hipóteses prováveis para explicar poderia ser uma incapacidade da GS daqueles animais de catalisarem a reação de formação do GHA ou outra hipótese poderia ser a existência de inibidores da enzima que surgiriam durante o processo de extração da GS.

A determinação dos valores de K_M aparente e V_{max} para Gln da glutamina sintetase de fígado, baço e rim de rato; fígado e coração de pomba e fígado de cobra na presença de diferentes concentrações de Mn^{+2} mostrou que provavelmente para GS de um mesmo órgão teríamos um valor de K_M e diferentes valores de V_{max} , assim, encontramos os seguintes valores médios de K_M aparente:

<u>ÓRGÃO</u>	<u>K_M</u>
Fígado de cobra	64,5
Fígado de pomba	55,8
Coração de pomba	39,8
Fígado de rato	67,5
Baço de rato	64,2
Rim de rato	120,4

Os valores de K_M de GS de fígado e baço de rato são próximos, enquanto que diferem muito da de rim, sendo que este é quase o dobro. Este fato sugere que GS de diferentes órgãos devam ser isoenzimas.

A grande alteração dos valores de V_{MAX} e o valor constante do K_M para Gln encontrados em diferentes concentrações de Mn^{2+} , de cada GS estudada, sugere que a cinética das reações catalisadas por essas enzimas seria semelhante a observada numa inibição não competitiva.

V. RESUMO

A glutamina sintetase [L-glutamato:amônia ligase (ADP) E.C.6.3.1.2.], enzima regulatória do metabolismo do glutamato e da amônia, é amplamente encontrada em vegetais, animais e microorganismos. Todavia não pudemos identificar a presença da GS em coração de rato ou em fígado e coração de vários anfíbios. Estudos foram efetuados sobre alguns fatores que afetam a atividade da GS como transferase na formação do gama-glutamilhdroxamato, a partir da reação catalisada pela GS entre a glutamina e hidroxilamina na presença de Mn^{2+} e arsenato. Foi demonstrado para essa reação enzimática que o ADP não é requerido quando se ensaiou a atividade da GS de fígado, rim e baço de rato; fígado e coração de pomba e fígado de cobra, ao contrário do estabelecido por vários autores que utilizam o ADP para determinar essa atividade da GS de microorganismos. Nossos dados sugerem que, para as GS dos órgãos animais estudados as melhores condições para a determinação da atividade enzimática são as seguintes: glutamina 75 mM, hidroxilamina 40 mM, arsenato 50 mM, Mn^{2+} 50 mM, Tris-acetato 0,1 M pH 7,5. A hidroxilamina em concentração acima de 40 mM e Mn^{2+} em concentração acima de 50 mM inibem a enzima, enquanto que concentrações de Asi acima de 40 mM (até 100 mM foram estudadas) mantêm o mesmo efeito sobre a reação enzimática.

Determinamos os valores de K_M aparente V_{max} para glutamina de GS dos órgãos dos animais estudados, na presença de concentrações de Mn^{+2} 5, 20, 50 ou 80 mM. Os valores de K_M aparente para GS de um determinado órgão é praticamente constante e os de V_{max} variavam significativamente, nas diferentes concentrações de Mn^{2+} . Esse comportamento é análogo ao de uma cinética de reação enzimática na presença de um inibidor não competitivo. Os valores de K_M aparente para glutamina de GS de órgãos diferentes de um mesmo animal, são diferentes entre si.

VI. ABSTRACT

The glutamine synthetase [L-glutamate:ammonia ligase (ADP) E.C.6.3.1.2.] (GS), regulatory enzyme of glutamate and ammonia metabolism, is extensively found in plants, animals and microorganism. However we could not found GS in rat heart or in liver and heart of several amphibians. We studied some factors that affect the formation of gamma-glutamylhydroxamate from the transfer reaction between glutamine and hydroxamine catalysed by GS, in the presence of Mn^{2+} and arsenate. Several authors use ADP in this enzyme reaction of microorganism GS, but we demonstrated that ADP is not required for the activity of GS from liver, kidney and spleen of rat; liver and heart of dove and liver of snake. Our data suggest the best reagent concentration for obtaining the highest GS activity, in our experimental conditions, are the following: glutamine 75 mM, hydroxamine 40 mM, sodium arsenate 50 mM, $MnCl_2$ 50 mM, Tris-acetate 0,1 M, pH 7,5. Larger concentrations of hydroxamine than 40 mM and Mn^{2+} than 50 mM cause an inhibition on enzyme activity, but larger concentrations of arsenate than 50 mM do not.

We determined the values of apparent K_M and V_{max} for glutamine of GS from the studied animals organs in the presence of Mn^{2+} at concentrations of 5, 20, 50 or 80 mM. For a specific animal organ it was found K_M appro-

ximately constant but the $V_{\max}$ varies significantly in function of different Mn^{2+} concentration. This behavior is analog to the enzyme kinetics of non-competitive inhibition. The apparent K_M values for glutamine of GS from different organs of same animal, are different for each organ enzyme.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADLER, S.P.; PURICH, D. and STADTMAN, E.R. Cascade control of Escherichia coli glutamine synthetase: properties of the P_{II} regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. J. Biol. Chem., 250(16):6264-6272, 1975.

BUCHANAN, J.M. Biosynthesis of purine nucleotides. In: CHARGAFF, E. and DAVIDSON, J.N. The Nucleic Acids. New York, 1960, 3:3030-322.

CALDAS, R.A. Purification and characterization of glutamine synthetase from suspension culture of wild carrot (Daucus carota L). Tese para a obtenção do Título de Ph.D., apresentada no Departamento de bioquímica da Universidade Estadual de Ohio, Ohio, USA, 1971.

COHEN, P.P. Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. Science, 168:533-543, 1970.

DARROW, R.A. and KNOTTS, R.R. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78(2):554-559, 1977.

DEUEL, T.F. and STADTMAN, E.R. Some kinetic properties of Bacillus subtilis glutamine synthetase. J. Biol. Chem., 245(20):5206-5213, 1970.

DEUEL, T.F.; LERNER, A. and ALBRYCHT, D. Regulatory properties of rat liver glutamine synthetase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48:1419-1425, 1972.

EDWARDS, J.M.; GIBSON, F., JACKMAN, L.M. and SHANNON, J.S. The source of the nitrogen atom for the biosynthesis of anthranilic acid. Biochem. Biophys. Acta. 93:78-84, 1964.

FERGUSON, A.R. and SIMS, A.P. The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. J. Gen. Microbiol. 80:159-171, 1974.

FERGUSON, A.R. and SIMS, A.P. The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the inactivation of glutamine synthetase. J. Gen. Microbiol. 80:173-185, 1974.

HOLZER, A. Regulation of enzymes by enzyme-catalyzed chemical modification. In: NORD, F.F. Advances in Enzymology. New York, 1969, 32:297-326.

HURLBERT, R.B. and CHAKROBORTY, K.P. Glutamine as amino donor for cytidine nucleotide biosynthesis. Federation Proc. 20:361-365, 1961.

KINGDOM, H.S.; SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase. VII-Adenyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58:642-649, 1967.

KINGDOM, H.S.; SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase. VIII-ATP:glutamine synthetase adenyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58:1703-1710, 1967.

LELOIR, L.F. and CARDINI, C.E. The biosynthesis of glucosamine. Biochem. Biophys. Acta. 12:15-22, 1953.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.

MANGUM, J.H., MAGNI, G. and STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation by the enzymatic uridylation and deuridylation of the P_{II} regulatory protein. Arch. Biochem. Biophys., 158:514-525, 1973.

MECKE, D.; WULFF, K.; LIESS, K. and HOLZER, H. Characterization of a glutamine synthetase inactivating enzyme from E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24:452-458, 1966.

MEISTER, A. Amide transfer (survey) In: BOYER, P.D.; LARDY, H. and MYRBACK, K. The enzymes. New York, 1962, 6:193-247.

MEISTER, A. The specificity of glutamine synthetase and its relationship to substrate conformation at the active site
In: NORD, F.F. Advances in Enzymology. New York, 1968, 31: 183-218.

NEIDLE, A. and WAELSCHE, H. The origin of the imidazole ring in Escherichia coli J. Biol. Chem. 234:586-591, 1959.

PALACIOS, R. Neurospora crassa Glutamine synthetase. Purification by affinity chromatography and characterization of sbunit structure. J. Biol. Chem., 251(15):4787-4791, 1976.

PIERRARD, A. and WIANE, J.M. Regulation and mutation affecting glutamine-dependent formation of carbamyl phosphate in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 15: 76-81, 1964.

QUINTO, C., MORA, J. and PALACIOS, R. Neurospora crassa glutamine synthetase. Role of enzyme synthesis and degradation on the regulation of enzyme concentration during exponential growth. J. Biol. Chem., 252(23):8724-8727, 1977.

RHEE, S.G. and CHOCK, P.B. Mechanistic studies of glutamine synthetase from E. coli: kinetics of ADP and orthophosphate binding to the unadenylylated enzyme. Biochemistry, 15(8):1755-1760, 1976.

RHEE, S.G.; PARK, R. and WITTENBERGER, M. New enzymic assays for glutamine synthetase adenylyltransferase and its regulatory protein P_{IIA}. Analytical Biochem., 88:174-175, 1978.

- RONZIO, R.A.; ROWE, W.B.; WILK, S. and MEISTER, A. Preparation and studies on the characterization of sheep brain glutamine synthetase. Biochemistry, 8, 2670-2674, 1969.
- SEGAL, A.; BROWN, M.S. and STADTMAN, E.R. Metabolite regulation of the state of adenylylation of glutamine synthetase. Arch. Biochem. Biophys., 161, 319-327, 1974.
- SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. 5'-adenylyl-o-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from Escherichia coli. J. Biol. Chem., 243: 3769-3771, 1968.
- SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. Glutamine synthetase (E. coli). In: COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, 1970, 17A: 910-922.
- SIMS, A.P. and FERGUSON, A.R. The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis. Studies with $^{15}\text{NH}_3$ to measure in vivo rates of glutamine synthesis. J. Gen. Microbiol., 80, 143-158, 1964.
- STADTMAN, E.R. and GINSBURG, A. Properties glutamine synthetase (Escherichia coli). In: BOYER, P.D.; LARDY, H. and MYRBACK, K. The Enzymes. New York, 1974, 10: 755-807.
- STAHL, J. and JAENICKE, L. Investigations of the structure of glutamine synthetase from pig brain. Eur. J. Biochem., 29: 401-407, 1972.

- TAHIN, Q.S.; GARBOGGINI, S.B.; ROSSIN, V.R. and PIMENTEL, E.R. Morphological change relationships during Pipa carvalhoi and Hyla geographica metamorphosis. Ciencia e Cultura, 29(8):925-927, 1977.
- TATE, S.S.; LEU, F. and MEISTER, A. Rat liver glutamine synthetase: preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. J. Biol. Chem., 247(17):5312-5321, 1972.
- TIEMEIER, D.C. and MILMAN, G. Chinese hamster liver glutamine synthetase: purification, physical and biochemical properties. J. Biol. Chem., 247(8):2272-2277, 1972a.
- TIEMEIER, D.C. and MILMAN, G. Regulation of glutamine synthetase in cultured chinese hamster cells: induction and repression by glutamine. J. Biol. Chem., 247(18):5722-5727, 1972b.
- WADE, H.E.; ROBINSON, H.K. and PHILLIPS, B.W. Asparaginase and glutaminase activities of bacteria. J. Gen. Microbiol., 69: 299-312, 1971.
- WEDLER, F.C.; KENNEY, R.M.; ASHOUR, A.E. and CARFI, J. Two regulatory isozymes of Glutamine synthetase from Bacillus caldolyticus an extreme thermophile. Biochem. Biophys. Res. Commun., 81(1):122-126, 1978.
- WELLNER, V.P. and MEISTER, A. Binding of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate by glutamine synthetase. Biochemistry, 5:872-879, 1966.

WOOLFOLK, C.A.; SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase: I. purification and properties of glutamine synthetase from Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys., 116:177-192, 1966.