



R.4483

BIOSINTESIS DE GLUTAMATO EN *Chlamydomonas reinhardtii*.  
PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS CON ACTI  
VIDAD GLUTAMATO SINTASA.

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas por el Licenciado ANTONIO JOSE MARQUEZ CABEZA

Sevilla, Marzo de 1985

DIRECTOR

Dr. José Ma Vega Piqueres  
Catedrático de Bioquímica

CODIRECTOR Y PONENTE

Dr. Julio Pérez Silva  
Catedrático de Microbiología

11-3-85

T.D. MO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

TD  
110

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral ~~en~~ Biosíntesis de glutamato en *Chlamydomonas reinhardtii* - Purificación y propiedades de la enzima con actividad glutamato sea consultada, según la modalidad/es indicadas: mutuo

- si - Consulta en depósito.
- si - Préstamo interbibliotecario.
- si - Reproducción parcial.
- si - Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Antonio J. Márquez Cabeza

Firmado:

Sevilla, a 9 de Marzo de 1995

N.B. La Tesis esta publicada por parte en su totalidad

Dr. JULIO PEREZ SILVA, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA que el trabajo titulado: "BIOSINTESIS DE GLUTAMATO EN *Chlamydomonas reinhardtii*. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA", presentado por D. Antonio José Márquez Cabeza para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, bajo la dirección del Prof.Dr.D.José María Vega Piqueres, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Química de esta Universidad, actuando como codirector y ponente el Prof.Dr.D.Julio Pérez Silva.

Y, para que conste expido el presente certificado en Sevilla, a ocho de Marzo de mil novecientos ochenta y cinco.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr.D.Julio Pérez Silva, que ha tenido la gentileza de permitirme utilizar las instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología para la realización de esta Tesis Doctoral, proporcionando siempre su dirección, apoyo y colaboración, y al Profesor Dr.D. José Ma Vega Piqueres, cuya infatigable dedicación a la labor realizada ha supuesto, en todo momento, una magnífica dirección, a la vez que un fabuloso estímulo, proporcionando todos los medios y facilidades que han sido necesarios.

Al Dr.D.Francisco Galván, agradezco su estrecha colaboración, que ha sido de tremenda utilidad en la realización de este trabajo, así como sus magníficas cualidades, que me han llevado a considerarlo siempre como un fabuloso compañero y amigo. A Dña. Cecilia Gotor y D. Luis Romero, quiero agradecer también su cordial amistad y su valiosa ayuda en la obtención de algunos de los resultados aquí presentados.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Profesor Dr.D. Antonio V. Xavier, del Instituto Superior Técnico de la Universidad de Lisboa, por las facilidades brindadas para la realización de los estudios de EPR, así como sus valiosas sugerencias al respecto, y al Dr.D. Emilio Fernández, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba, por su importante aportación en los resultados presentados sobre la ferredoxina.

A los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, con quienes he convivido durante la realización de esta Tesis Doctoral, agradezco la colaboración y apoyo que en todo momento supieron dispensarme.

A los Departamentos de Fisicoquímica Aplicada de la Facultad de Farmacia y de Química Analítica de la Facultad de Química, quiero agradecer las oportunidades brindadas de utilización de sus respectivos espectrofluorímetros, e, igualmente, al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología, la posibilidad de utilizar sus ultracentrífugas, el espectrofotómetro Aminco, y el densitómetro.

Por último, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia, la concesión de una beca de F.P.I., y a la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, la financiación del proyecto de investigación nº 0252, por haber posibilitado económicamente la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

A Conchita, que tuvo que sufrir los días grises de la Investigación, y que con cariño siempre supo alentarme, y a Javier, que vio la luz casi al tiempo que esta Tesis.

A mis padres, que siempre desearon lo mejor para mí, y para los que deseo que esta Tesis sea un cálido homenaje a su vida de abnegación y sacrificio.

A vosotros Pepe, Curro, Luis y Cecilia, que me tuvisteis que soportar durante este tiempo.

A cuantos, de una forma u otra, colaboraron en mi formación humana y científica.

A quienes supieron brindarme su amistad, colaboración y estímulo haciendo que la vida resultara de colores, especialmente ... Chlamydomonas.

## INDICE

ABREVIATURAS .....	1
I. INTRODUCCION .....	3
II. MATERIALES Y METODOS .....	16
A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	17
1. <i>Organismos empleados</i> .....	17
2. <i>Condiciones de cultivo</i> .....	17
B. PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS LIBRES DE CELU <u>L</u> LAS .....	19
1. <i>Recolección de células</i> .....	19
2. <i>Métodos de rotura y preparación de extractos</i> <i>crudos</i> .....	19
1. Rotura por sonicación .....	19
2. Rotura por congelación-descongelación en ni <u>tr</u> trógeno líquido .....	20
3. Rotura por ultravibración con perlas de vi- drio .....	20
C. DETERMINACIONES ANALITICAS .....	21
1. <i>Proteína</i> .....	21
2. <i>Clorofila</i> .....	22
3. <i>Amonio</i> .....	23
4. <i>Glutamato</i> .....	23
5. <i><math>\gamma</math>-glutamil hidroxamato</i> .....	25
6. <i>Análisis cuantitativo de grupos prostéticos</i> ..	28
1. Flavinias .....	28
2. Hierro .....	31
3. Sulfuro lábil .....	32
7. <i>Análisis de aminoácidos de la ferredoxina</i> ...	33
D. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS .....	33
1. <i>NADH-glutamato sintasa</i> .....	34
2. <i>NADH-ferricianuro reductasa</i> .....	35
3. <i>Fd-glutamato sintasa</i> .....	35



II.D.4. <i>MVH-glutamato sintasa</i> .....	36
5. <i>Glutamina sintetasa</i> .....	36
6. <i>Catalasa</i> .....	37
7. <i>Alcohol deshidrogenasa</i> .....	37
E. PURIFICACION DE PROTEINAS .....	38
1. <i>Purificación de la NADH-glutamato sintasa</i> ....	38
2. <i>Purificación de la ferredoxina</i> .....	39
3. <i>Purificación de la Fd-glutamato sintasa</i> .....	40
F. TECNICAS EXPERIMENTALES .....	41
1. <i>Centrifugaciones</i> .....	41
2. <i>Determinación del coeficiente de sedimentación por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa</i> .....	42
3. <i>Determinación del radio de Stokes por filtra- ción en gel</i> .....	43
4. <i>Electroforesis</i> .....	45
1. <i>Electroforesis analítica en geles de polia- crilamida</i> .....	45
2. <i>Localización de las proteínas en los geles de electroforesis</i> .....	46
3. <i>Localización de la actividad NADH-diaforasa en los geles de electroforesis</i> .....	46
4. <i>Electroforesis en presencia de SDS</i> .....	46
5. <i>Determinación del punto isoeléctrico por elec- troenfoque</i> .....	48
6. <i>Determinaciones espectrofotométricas</i> .....	48
7. <i>Determinaciones espectrofluorimétricas</i> .....	49
8. <i>Titulaciones potenciométricas</i> .....	49
9. <i>Resonancia paramagnética del electrón (EPR)</i> ..	50
10. <i>Preparación de la columna de Ferredoxina-Sefa- rosa</i> .....	51
11. <i>Cromatografía en capa fina</i> .....	51
12. <i>Técnicas de concentración de proteínas</i> .....	52
1. <i>Precipitación con sulfato amónico</i> .....	52
2. <i>Ultrafiltración</i> .....	52
3. <i>Evaporación bajo corriente de argon</i> .....	52

II.F.13. <i>Diálisis</i> .....	53
14. <i>Medidas del pH</i> .....	53
G. REACTIVOS .....	53
III. RESULTADOS .....	55
A. ASIMILACION DE AMONIO POR DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Chlamydomonas reinhardii</i> .....	56
B. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA EN CELULAS DE <i>Chlamydomonas reinhardii</i> PERMEABILIZADAS CON TOLUENO Y EN EXTRACTOS CRUDOS DEL ALGA .....	56
C. NIVELES DE ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO .....	66
D. SEPARACION POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA, A PARTIR DE EXTRACTOS CRUDOS DE <i>Chlamydomonas reinhardii</i> .....	72
E. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE <i>Chlamydomonas reinhardii</i> .....	74
1. <i>Comentarios sobre el método de purificación</i> .	74
2. <i>Estudios catalíticos y cinéticos</i> .....	79
1. <i>Actividades del complejo enzimático NADH-GOGAT</i> .....	79
2. <i>Especificidad por sustratos</i> .....	79
3. <i>Valores de <math>K_m</math> para los diferentes sustratos</i>	80
4. <i>pH óptimo</i> .....	80
5. <i>Temperatura óptima</i> .....	85
6. <i>Inhibidores</i> .....	87
7. <i>Efecto de los sustratos y productos sobre la actividad</i> .....	92
3. <i>Determinación de parámetros fisicoquímicos</i> ..	95
1. <i>Radio de Stokes</i> .....	95
2. <i>Coefficiente de sedimentación</i> .....	95
3. <i>Peso molecular</i> .....	99
4. <i>Coefficiente de fricción</i> .....	99
4. <i>Espectro de absorción</i> .....	100

III.F. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	100
1. Comentarios sobre el método de purificación y criterio de pureza .....	100
2. Determinación de parámetros fisicoquímicos .	103
1. Radio de Stokes y coeficiente de sedimenta ción .....	103
2. Peso molecular .....	103
3. Coeficiente de fricción .....	104
4. Punto isoeléctrico .....	104
3. Composición .....	107
1. Aminoácidos .....	107
2. Grupos prostéticos .....	107
4. Medida del potencial normal .....	111
G. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA- GLUTAMATO SINTASA DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	114
1. Comentarios sobre el método de purificación y criterio de pureza .....	114
2. Estudios catalíticos y cinéticos .....	121
1. Donadores de electrones y especificidad por los sustratos .....	121
2. pH óptimo .....	124
3. Temperatura óptima .....	124
4. Valores de $K_m$ para los diferentes sustra- tos .....	124
5. Inhibición de la actividad .....	128
6. Efecto de los sustratos sobre la actividad	131
3. Determinación de parámetros fisicoquímicos .	131
1. Radio de Stokes .....	131
2. Coeficiente de sedimentación .....	131
3. Peso molecular de la proteína nativa .....	131
4. Peso molecular de la Fd-GOGAT en condicio- nes desnaturizantes con SDS, y estima ción del número de subunidades .....	135
5. Coeficiente de fricción .....	139

III.G.4. <i>Identificación de grupos prostéticos</i> .....	139
1. Espectros de absorción de la Fd-GOGAT nativa en su estado oxidado y reducido .....	139
2. Espectros de absorción del componente flavínico de la Fd-GOGAT .....	141
3. Espectros de emisión de fluorescencia de la Fd-GOGAT nativa y de su componente flavínico .....	141
4. Análisis cuantitativo del componente flavínico .....	141
5. Espectro de absorción de la deflavoenzima.	145
6. Determinación analítica de hierro y sulfuro lábil .....	145
7. Espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR) .....	145
5. <i>Información acerca del mecanismo de la reacción</i> .....	149
IV. DISCUSION .....	155
V. CONCLUSIONES .....	184
VI. BIBLIOGRAFIA .....	190

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AcH	Ácido acético
ADP	Adenosín-5'-difosfato
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BV	Bencil viológeno oxidado
BVH	Bencil viológeno reducido
chl	Clorofila
DEAE	Dietilaminoetil
DON	6-diazo-5-oxo-1-norleucina
DPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DTE	2,3-dihidroxi-1,4-ditioibutano (ditioeritritol)
$E_{\lambda}$	Coefficiente de extinción a la longitud de onda $\lambda$
$e^{-}$	Electrón
$E'_{0}$	Potencial normal
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
FAD	Flavín adenín dinucleótido
Fd	Ferredoxina
$Fd_{ox}$	Ferredoxina oxidada
$Fd_{red}$	Ferredoxina reducida
Fd-GOGAT	Ferredoxina-glutamato sintasa
FMN	Flavín mononucleótido
$g$	Aceleración de la gravedad
$g$	Factor característico del paramagnetismo de las moléculas en EPR
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamina-oxoglutarato aminotransferasa= glutamato sintasa
$K_m$	Constante de Michaelis
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MV	Metil viológeno oxidado
MVH	Metil viológeno reducido

MVH-GOGAT	MVH-glutamato sintasa
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH ó NADPH
NAD(P)H-GOGAT	NAD(P)H-glutamato sintasa
<i>p</i> HMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
S	Unidad Svedberg (10 <sup>-13</sup> s)
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina
TRIS	Tri-(hidroximetil)-amino metano
U	Unidad de actividad enzimática

## I. INTRODUCCION

Los animales son incapaces de reducir el nitrógeno i norgánico, y, aunque pueden incorporar amonio para sintetizar un pequeño número de aminoácidos, éste no es un constituyente normal de su dieta. Además, son incapaces de construir los esqueletos carbonados de varios aminoácidos (lisina, metionina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina).

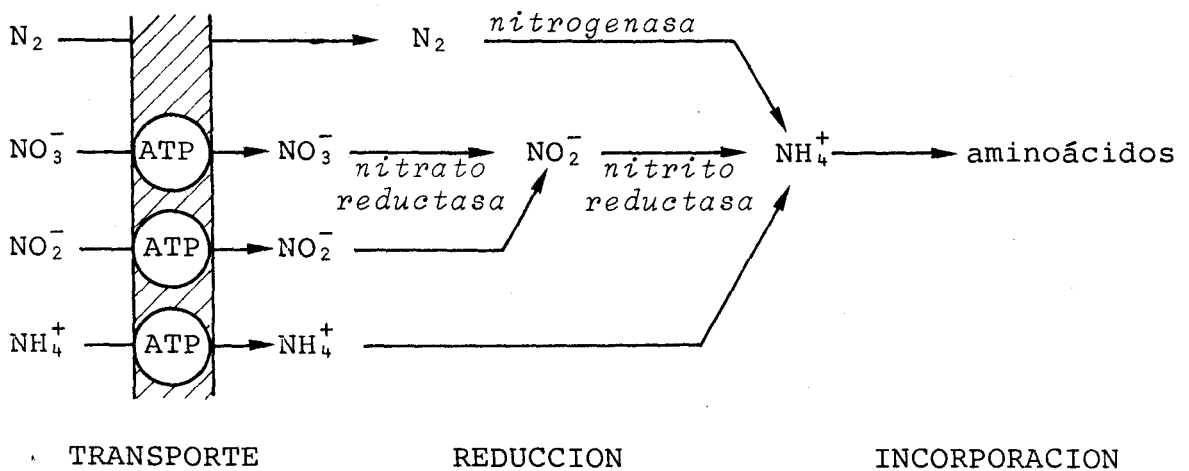
Por este motivo, la mayor parte de sus requerimientos nitrogenados tiene que ser abastecida, directa o indirectamente, a partir del metabolismo fotosintético de los vegetales, los cuales, merced al concurso de la energía solar, son capaces de asimilar los compuestos nitrogenados inorgánicos, utilizando para ello el agua como fuente última del poder reductor.

Las distintas formas de nitrógeno inorgánico que pueden utilizar los organismos fotosintéticos ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), son asimiladas por un proceso que incluye tres etapas fundamentales:

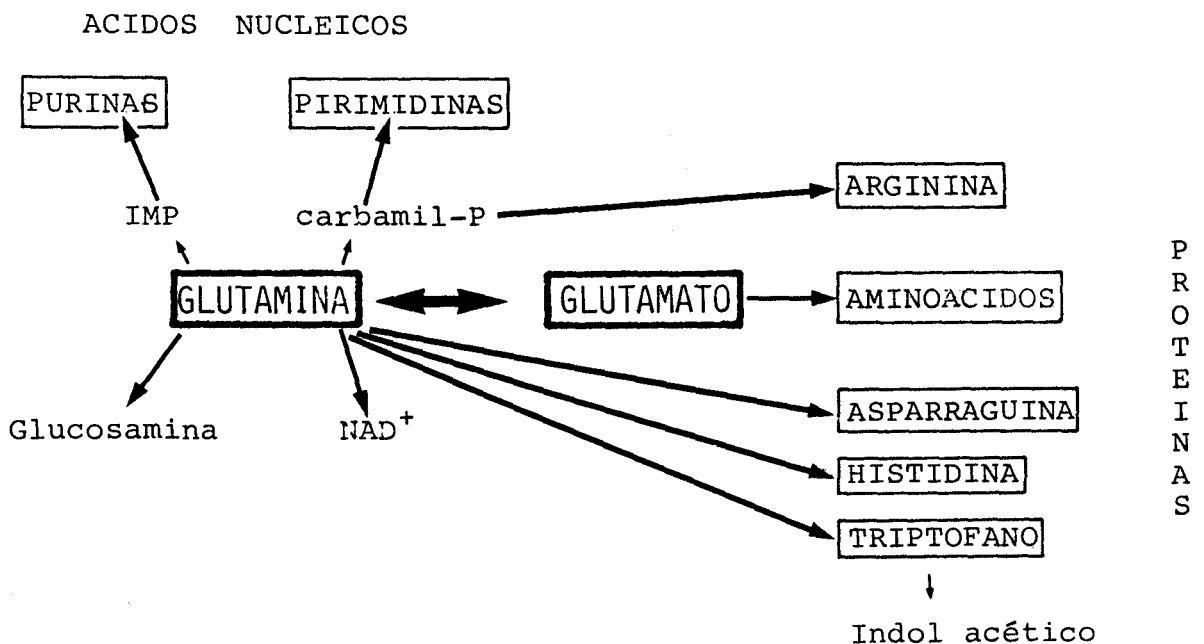
- 1) Transporte, proceso que, para el caso de las formas de nitrógeno combinado, es dependiente de energía y está mediado por permeasas específicas (Florencio y Vega, 1982; Eisele y Ullrich, 1977).
- 2) Reducción hasta  $\text{NH}_4^+$ . Partiendo de  $\text{NO}_3^-$  este proceso está catalizado por la acción sucesiva de dos metaloenzimas; la nitrato reductasa, que cataliza la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , y, la nitrito reductasa, que cataliza la reducción del  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{NH}_4^+$  (Hewitt *et al.*, 1976; Syrett y Leftley, 1976; Losada *et al.*, 1981). En el caso del  $\text{N}_2$ , la reducción hasta  $\text{NH}_4^+$  está mediada por la nitrogenasa (Zumft, 1981).
- 3) Incorporación del amonio a esqueletos carbonados, proceso conocido como *asimilación de amonio*.



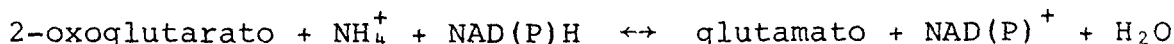
Esquemáticamente, estas tres etapas pueden expresarse así:



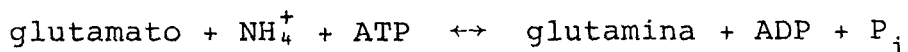
Los productos organonitrogenados primarios de la asimilación del amonio son la glutamina y el glutamato. Por este motivo, dichos aminoácidos ocupan posiciones centrales en el metabolismo intermediario de los compuestos nitrogenados, ya que son los encargados de distribuir este elemento para la síntesis de otros aminoácidos y bases nitrogenadas, constituyentes de proteínas y ácidos nucleicos respectivamente, así como de muchos metabolitos nitrogenados, indispensables para el desarrollo celular, tal y como se muestra a continuación:



Durante muchos años, la vía principal establecida para la asimilación del amonio era la aminación reductiva del 2-oxoglutarato, catalizada por la enzima NAD(P)<sup>+</sup>-glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3), según la siguiente reacción:



En cooperación con esta enzima, actuaría otra, la glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2), capaz de catalizar la síntesis de glutamina por amidación del glutamato, con el concurso de ATP, de acuerdo con la siguiente reacción:



A pesar de la rápida formación de glutamina en tejidos y células asimilando amonio, no se conocía ningún mecanismo por el cual el grupo amida de la glutamina, formado por dicha reacción, pudiera también transferirse como grupo  $\alpha$ -amino para la síntesis de aminoácidos.

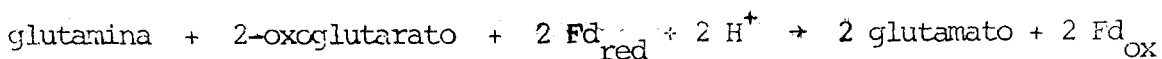
Sin embargo, la situación cambió desde que en 1970, Tempest, Meers y Brown (Tempest *et al.*, 1970) identificaron en bacterias una enzima que podía catalizar la transferencia reductiva dependiente de NADPH del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, originando la formación de glutamato, según la siguiente reacción:



Esta enzima se denominó inicialmente glutamina(amido)-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), o abreviadamente glutamato sintasa. La Unión Internacional de Bioquímica (IUB) la denominó L-glutamato:NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa (tran

saminante) (EC 1.4.1.13).

Posteriormente se identificó una enzima diferente, la ferredoxina-glutamato sintasa (EC 1.4.1.7), que fue encontrada en hojas de plantas superiores (Lea y Mifflin, 1974), y que catalizaba la misma reacción de síntesis de glutamato, sólo que utilizando ferredoxina reducida, en vez de NADPH, como fuente de poder reductor, de acuerdo con la siguiente reacción:



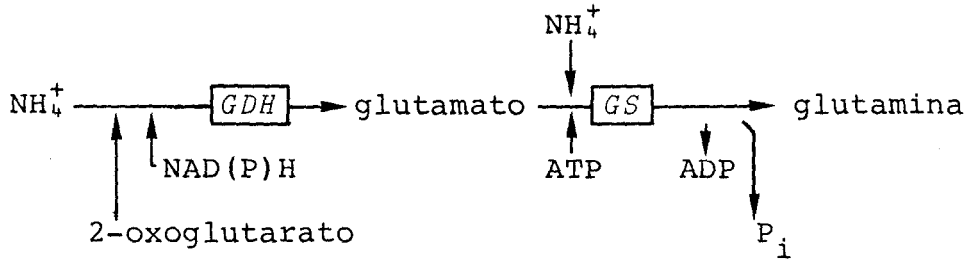
Al mismo tiempo, se encontró también una GOGAT dependiente de piridín nucleótidos en tejidos no fotosintéticos de plantas superiores (Dougall, 1974).

Actualmente se sabe que las glutamato sintasas están ampliamente distribuídas en la escala biológica, variando en los diferentes organismos la especificidad que presenta la enzima por el donador de electrones, bien sea NADPH, NADH ó ferredoxina.

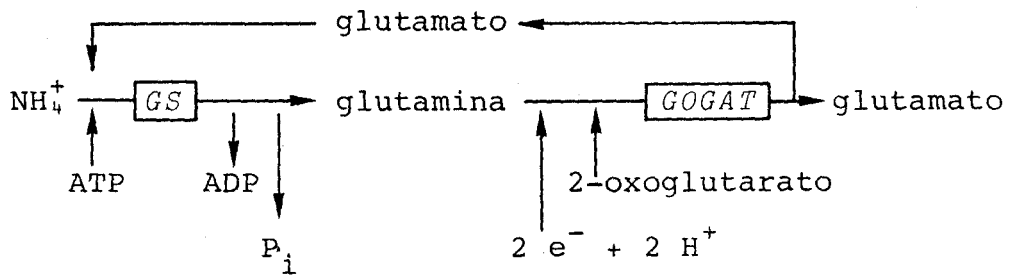
Si bien estaba claro que la síntesis de glutamina en los distintos organismos se debía a la acción de la glutamina sintetasa, a partir del descubrimiento de las GOGATs se empezó a cuestionar cuál sería realmente el mecanismo de la biosíntesis de glutamato, discutiéndose así las posibilidades de la GDH en el papel clave que se le había atribuído en la asimilación del amonio.

Surgen, por tanto, dos rutas metabólicas para explicar la incorporación del amonio a esqueletos carbonados, catalizadas respectivamente por sistemas enzimáticos diferentes. Por un lado, la vía GDH-GS, que actúa según el

esquema que se muestra a continuación:



y cuyo resultado neto es la formación de 1 molécula de glutamina a expensas de 2 de amonio y 1 de 2-oxoglutarato, con el consumo de 1 ATP y 2  $e^-$ , que suministran los piridín nucleótidos reducidos, y, por otro, la ruta GS-GOGAT o ciclo glutamato sintasa que opera según el siguiente esquema:



y que, como puede observarse, tiene carácter cíclico ya que el glutamato actúa a la vez como sustrato y como producto de la asimilación del amonio. El balance neto de la actuación de esta vía supone la formación de una molécula de glutamato a expensas de una de amonio y otra de 2-oxoglutarato, con el consumo de 1 ATP, y 2  $e^-$ , que provienen de la ferredoxina o los piridín nucleótidos reducidos.

Desde la hipótesis inicial de que los organismos fotosintéticos utilizaban exclusivamente la ruta GS-GOGAT para la asimilación del amonio (Lea y Mifflin, 1974), un gran número de evidencias experimentales han sostenido

dicha afirmación, si bien en algunas algas parece que, en determinadas condiciones ambientales, actúa preferentemente la ruta GDH-GS (McKenzie *et al.*, 1979; Everest y Syrett, 1983).

Por otra parte, se ha demostrado que este ciclo GS-GOGAT no solamente opera en la asimilación primaria del amonio, sino también en su reasimilación tras la liberación que tiene lugar en el interior de las células de este compuesto, debido a diversas facetas del metabolismo, de las cuales la más importante cuantitativamente es la fotorrespiración (Mifflin *et al.*, 1980).

Además de las rutas hasta ahora mencionadas, también se han descrito otras vías alternativas o complementarias para la incorporación del amonio a esqueletos carbonados, en las que están implicadas enzimas tales como la alanina deshidrogenasa, aspartato deshidrogenasa, o asparraguina sintetasa, acopladas con las respectivas transaminasas que conducen finalmente a la síntesis de glutamato. Estas rutas, no obstante, no parecen tener un papel significativo en la asimilación de amonio, bajo condiciones normales de cultivo (Mifflin *et al.*, 1980), sino más bien bajo condiciones en las que la ruta principal de incorporación de amonio está bloqueada (Moreno-Vivián *et al.*, 1983).

En estirpes silvestres del alga verde *Chlamydomonas reinhardii* se ha puesto recientemente de manifiesto que la asimilación de amonio ocurre exclusivamente por la ruta GS-GOGAT, tanto en células crecidas en la luz como en la oscuridad (Cullimore y Sims, 1981 *b* ; Florencio y Vega, 1982).

Si bien la GS es una enzima abundantemente estudiada (para una revisión sobre el tema, ver Stewart *et al.*, 1980), incluyendo las del alga verde *C. reinhardii* (Florencio y Vega, 1983), la GOGAT es menos conocida en los dis

tintos organismos. La escasa información existente hasta la fecha acerca de la actividad GOGAT se debe, entre otras razones, a la dificultad de encontrar un método reproducible y rápido de medirla, y a la baja concentración de esta actividad en los extractos crudos. Por otra parte, en una preparación cruda pueden existir importantes interferencias debidas a la presencia de glutaminasa o glutamato deshidrogenasa así como de transaminasas, particularmente de glutamina(amino)-2-oxoglutarato transaminasa (Gross *et al.*, 1976; Arima, 1978; Miflin y Lea, 1977).

La GOGAT dependiente de piridín nucleótidos está ampliamente distribuída, tanto en organismos no fotosintéticos como en los fotosintéticos, procarióticos y eucarióticos. En los procariotas es específica para NADPH mientras que en los eucariotas funciona, en unos casos exclusivamente con NADH y, en otros, con ambos nucleótidos, aunque es más activa con NADH que con NADPH (Stewart *et al.*, 1980; Miflin *et al.*, 1981).

La NADPH-GOGAT ha sido caracterizada en bacterias no fotosintéticas tras su purificación por técnicas convencionales (Miller y Stadman, 1972; Geary y Meister, 1977; Adachi y Suzuki, 1977; Hemmilä y Mäntsälä, 1978), y recientemente se ha abordado su purificación y caracterización en los procariotas fotosintéticos (Yelton y Yoch, 1981; Khanna y Nicholas, 1983), con excepción de las cianobacterias, donde está ausente (Lea *et al.*, 1982). Se trata de una flavoproteína sulfoférica formada por dos tipos de subunidades; una, de peso molecular del orden de 150.000 y, otra, del orden de 50.000, pudiéndose aislar la proteína, según las condiciones de extracción, como un octámero con 4 subunidades de cada tipo (peso molecular alrededor de 800.000) o un dímero con una subunidad de cada clase (peso molecular alrededor de 200.000).

En lo que respecta a los organismos eucarióticos no fotosintéticos, se ha purificado y caracterizado parcial-

mente la NADH-GOGAT de levadura (Roon *et al.*, 1974) y de *Neurospora crassa* (Hummelt y Mora, 1980).

En las plantas superiores se ha localizado la actividad NAD(P)H-GOGAT sobre todo en tejidos no fotosintéticamente activos, como los guisantes en germinación (Beevers y Storey, 1976), nódulos de altramuz (Boland y Benny, 1977), cultivo de células de semilla de soja (Chiu y Shargool, 1979) y tallos etiolados de guisante (Match *et al.*, 1980 b). En cuanto a la localización intracelular de esta enzima, no se sabe con certeza pues existe una cierta controversia al respecto. Así, la enzima de cotiledones de guisante en desarrollo no está asociada a ningún orgánulo (Beevers y Storey, 1976), mientras que la de cultivos de tejidos (Washitani y Sato, 1978) y de raíces (Emes y Fowler, 1979), se ha encontrado exclusivamente en los plastos .

Por lo que concierne a las algas, tan sólo se ha descrito la presencia de NADH-GOGAT en *Euglena gracilis* (Miyatake y Kitaoka, 1981) y en *Chlamydomonas reinhardtii* (Cullimore y Sims, 1981 a), no habiéndose abordado hasta la fecha su purificación y caracterización.

Las GOGATs dependientes de piridín nucleótidos que han sido descritas en organismos eucarióticos tienen pesos moleculares entre 170.000 y 240.000, pero no ha podido sugerirse la presencia de grupos prostéticos, con excepción de la enzima de nódulos de altramuz y tallos etiolados de guisante, donde se ha reportado la presencia de flavinas (Boland y Benny, 1977; Match *et al.*, 1980 b).

Por su parte, la GOGAT dependiente de ferredoxina está presente en cianobacterias, algas y plantas superiores (Lea *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1980), y su localización intracelular en las plantas superiores es cloroplástica (Rathnam y Edwards, 1976; Harel *et al.*, 1977; Walls-

grove *et al.*, 1979; Anderson y Done, 1977; Suzuki *et al.*, 1982), lo que guarda una estrecha correlación con la presencia de ferredoxina en dichos orgánulos, y establece una clara implicación de la enzima con la asimilación fotosintética del amonio, sugiriendo que es ésta también la localización probable para otros eucariotas fotosintéticos.

También se ha descrito la presencia de Fd-GOGAT en tejidos no fotosintéticos tales como las raíces de arroz (Arima, 1978), si bien parece que esta proteína es distinta a la de las hojas (Suzuki *et al.*, 1982).

La Fd-GOGAT de plantas superiores se ha purificado a partir de hojas de haba (Wallsgrave *et al.*, 1977), maíz (Match *et al.*, 1979a), espinaca (Tamura *et al.*, 1980; Hirasawa y Tamura, 1984) y arroz (Suzuki y Gadal, 1982), siéndolo hasta homogeneidad electroforética en los dos últimos organismos citados, con lo que ha sido posible su caracterización. Se trata de una proteína de pesos moleculares comprendidos entre 145.000 y 224.000, pero se conocen pocos detalles acerca de su composición (Mifflin *et al.*, 1981; Stewart *et al.*, 1980). La enzima mejor caracterizada ha sido la de espinaca, donde recientemente se ha demostrado que está formada por una única cadena polipeptídica de peso molecular 170.000, y que presenta 1 FAD, 1 FMN, 4 Fe y 4 S lábiles por molécula (Hirasawa y Tamura, 1984). Hasta entonces, todos los intentos efectuados para observar en la enzima de plantas superiores la presencia de grupos transportadores de electrones, habían resultado infructuosos (Wallsgrave *et al.*, 1977; Match *et al.*, 1979 a; Tamura *et al.*, 1980).

En algas eucarióticas, la actividad GOGAT dependiente de ferredoxina fue observada por vez primera en *Chlorella fusca* (Lea y Mifflin, 1975) y posteriormente en *Caulerpa simpliciuscula* (McKenzie *et al.*, 1979). Sin embargo, hasta la fecha, no se había abordado la purificación y ca



racterización de esta enzima en algas.

En términos generales, la información respecto a la Fd- y NADH-GOGATs de algas eucarióticas es muy escasa, no sólo en cuanto a su purificación y caracterización físico-química, sino también en lo referente a su papel fisiológico y regulación metabólica.

Concretamente, en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* sólo se había descrito la presencia de estas actividades en extractos crudos.

Por este motivo, pensamos que sería muy interesante estudiar estas enzimas en *C. reinhardtii*, con idea de obtener datos absolutamente necesarios a la hora de valorar el papel fisiológico y significado metabólico de ambas enzimas, que ocupan, sin duda alguna, un papel crítico en el metabolismo del nitrógeno.

Además, dado que la ferredoxina es una proteína que se comporta como sustrato fisiológico de la Fd-GOGAT, y que se desconocían sus propiedades fisicoquímicas y moleculares, era muy interesante proceder a su purificación y caracterización detallada.

De forma resumida, los puntos más importantes que aporta este trabajo son los siguientes:

1. Puesta a punto y caracterización de un ensayo adecuado para medir la actividad GOGAT en *Chlamydomonas reinhardtii*, tanto *in situ* como *in vitro*.
2. Estudios *in vivo* de asimilación de amonio, utilizando distintas estirpes de *C. reinhardtii*, y efecto de distintas condiciones metabólicas sobre el nivel de las actividades NADH- y Fd-GOGAT.

3. Purificación parcial de la NADH-GOGAT y estudio físico-químico y cinético de la proteína.
4. Purificación hasta homogeneidad, caracterización físico-química y cinética, y estudio de la composición de grupos prostéticos de las proteínas del sistema ferredoxina/Fd-GOGAT.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis, se han publicado de forma resumida en los siguientes artículos de revistas y aportaciones a congresos científicos:

a) Artículos en revistas

1. Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*.  
A.J.Márquez, F.Galván y J.M.Vega (1984)  
Plant Sci. Lett. 34, 305-314
2. Purification and molecular properties of ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*.  
F.Galván, A.J.Márquez y J.M.Vega (1984)  
Planta 162, 180-187

b) Comunicaciones presentadas a congresos

1. Estudio de las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa en estirpes silvestres y mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii*.  
F.Galván, A.J.Márquez y J.M.Vega (1982)  
X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica ,  
Santander, Resumen nº 59.

2. Utilización de amonio por estirpes silvestres y mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii*. Estudio de la ferredoxina-glutamato sintasa.  
F.Galván, A.J.Márquez y J.M.Vega (1983)  
II Congreso Luso-Español de Bioquímica, Barcelona, Resumen nº 173.
3. Purificación y caracterización de la NADH-glutamato sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.  
A.J.Márquez, F.Galván y J.M.Vega (1983)  
II Congreso Luso-Español de Bioquímica, Barcelona, Resumen nº 318.
4. Analytical and physico-chemical studies of the NADH-glutamato synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*.  
F.Galván, A.J.Márquez y J.M.Vega (1983)  
1<sup>st</sup> International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry, Córdoba, Resumen nº P.II.6 .
5. Caracterización fisicoquímica de la ferredoxina de *Chlamydomonas reinhardtii*.  
F.Galván, A.J.Márquez y E.Fernández (1984)  
XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Tenerife, Resumen nº 9.7.
6. Purificación y propiedades moleculares de la ferredoxina-glutamato sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.  
F.Galván, C.Gotor, A.J.Márquez y J.M.Vega (1984)  
XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Tenerife, Resumen nº 1.16
7. Identificación de grupos prostéticos en la ferredoxina-glutamato sintasa (Fd-GOGAT) de *Chlamydomonas reinhardtii*.  
A.J.Márquez, L.Romero, F.Galván y J.M.Vega (1984)  
XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Tenerife, Resumen nº 1.17

## II. MATERIALES Y METODOS

## II.A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

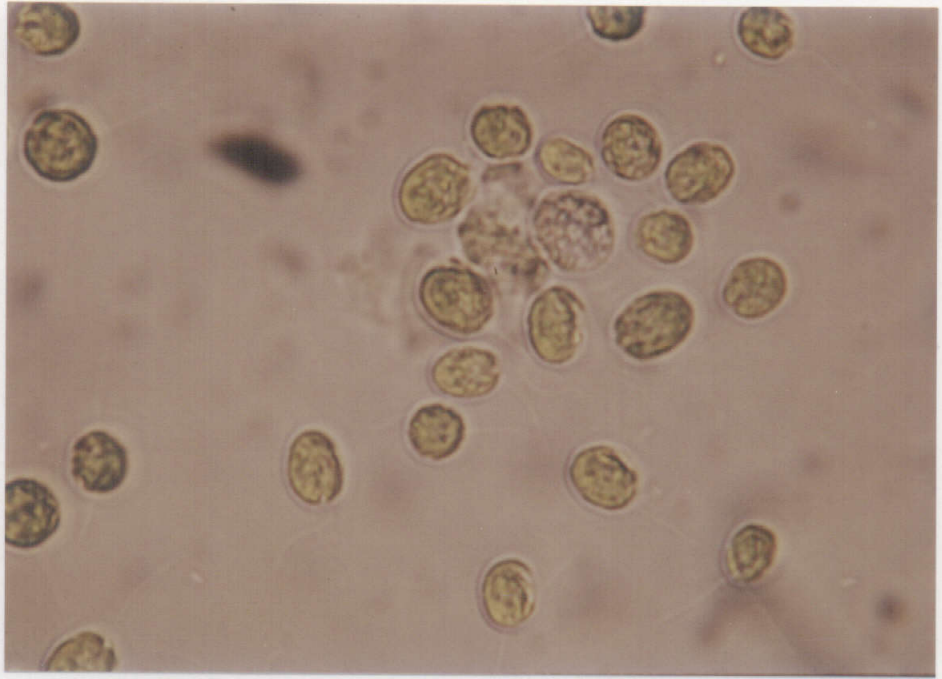
### II.A.1. Organismos empleados

En el presente trabajo se han utilizado las estirpes silvestres 6145 c y 21 gr, y mutantes 102, 104, 203, 301, 305 y 307 del alga clorofita unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, cedidas gentilmente por el Prof. Jacobo Cárdenas, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Todos estos mutantes están afectados en su capacidad de asimilar nitrato, por carecer de actividad NADH-nitrato reductasa, y requieren nitrito o amonio para su crecimiento. De las diferentes estirpes mencionadas, la utilizada para la purificación de las diferentes proteínas que se han estudiado fue la silvestre 21 gr, de la que la Fig. 1 recoge fotografías al microscopio óptico y electrónico.

### II.A.2. Condiciones de cultivo

Las células de *Chlamydomonas* se cultivaron en medio líquido en cámaras aclimatadas a 25 °C y con iluminación continua mediante tubos fluorescentes de luz blanca (15-20 W·m<sup>-2</sup> en la superficie del cultivo). El medio de cultivo empleado, a menos que se indique expresamente otra cosa, fue el descrito por Sueoka *et al.*, (1967), que contenía por litro: NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,44 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 g ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml de una disolución 61 mg ml<sup>-1</sup> ; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 ml de una disolución 10 mg·ml<sup>-1</sup>, y solución de trazas Hutner, 5 ml. La solución de trazas (Hutner *et al.*, 1950), se preparó como sigue: Se disolvieron en 550 ml de agua destilada, una a una y por el orden indicado, calentando a 100 °C y con agitación continua, las siguientes cantidades de productos: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,28 g ; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4,40 g ; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,02 g ; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,00 g ; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,32 g ; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,32 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,22 g. A esta disolución se añadió otra que contenía 10 g de EDTA (ácido libre) en 250 ml de agua destilada. La mezcla resultante de ambas disoluciones se llevó hasta 100 °C, y se dejó después enfriar hasta 80-90 °C, ajustando el pH final a 6,8. Se completó el volumen hasta 1 l con agua destilada, y se mantuvo en oscuridad durante 2 días hasta su utilización.

A



B

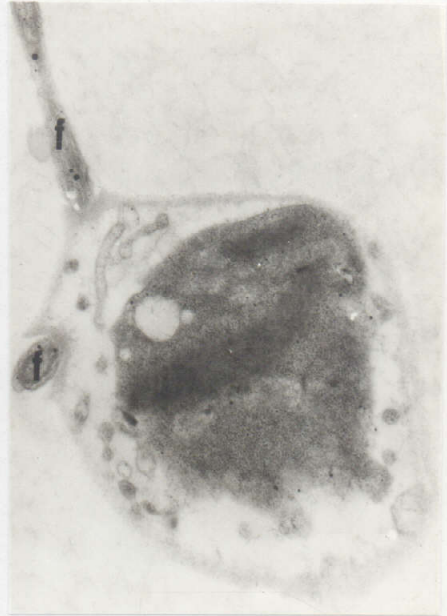
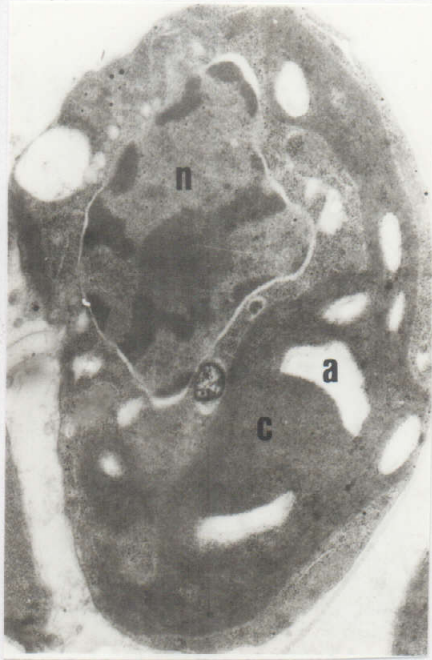


Figura 1. Fotografías al microscopio óptico y electrónico del alga clorofita unicelular flagelada *Chlamydomonas reinhardtii*, estirpe silvestre 21 gr.

- A. Fotografía al microscopio óptico (x 400), en campo claro, de una alicuota de un cultivo en medio líquido. Previamente, las células se inmovilizaron con formol.
- B. Fotografías al microscopio electrónico (x 10.000) de células fijadas con una mezcla de glutaraldehído y osmio y procesadas según las técnicas convencionales. n, núcleo; c, cloroplasto; f, flagelo; a, gránulo de almidón.

Los cultivos se realizaron normalmente en medio líquido utilizando tubos de vidrio de 250 ml o frascos de Roux de 1 l de capacidad, por los que se hacía pasar una corriente de aire enriquecido con un 5 % de CO<sub>2</sub> (V/V), que servía como fuente de carbono. Para obtener grandes masas de células se cultivaba del mismo modo en recipientes ortoédricos de metacrilato de 40 l de capacidad.

Las diferentes estirpes se mantuvieron en medio sólido, obtenido suplementando al medio líquido anteriormente mencionado Bacto-Agar DIFCO al 1,75 % (P/V). La axenia se conseguía esterilizando el medio y recipientes correspondientes en un autoclave SELECTA durante 20 min a 1 atmósfera de sobrepresión (121 °C). Los inóculos nuevos se expusieron a luz intensa para obtener un buen crecimiento inicial, y tras 3-4 días se trasladaron a luz difusa, a 25 °C. Los cultivos se refrescaban cada 3 meses.

## II.B. PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS LIBRES DE CELULAS

### II.B.1. *Recolección de células*

Las células se recogieron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 660 nm entre 1,5 y 2) por centrifugación a 20.000 x g utilizando el sistema de flujo continuo SORVALL KSB adaptado al rotor SS34 de una centrífuga refrigerada SORVALL RC5B, con un caudal de 0,5 l·min<sup>-1</sup>.

### II.B.2. *Métodos de rotura y preparación de los extractos crudos*

#### II.B.2.1. Rotura por sonicación

La masa celular se resuspendió en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,5, conteniendo DTE 0,2 mM y EDTA 0,5 mM (en lo sucesivo referido como tampón estándar), en una proporción de 5 ml

de tampón por g de peso húmedo de células. A continuación las células se rompieron, a 0 °C y 80 W, durante 3 periodos de 15 s, en un sonicador BRANSON, modelo B-12. El homogenado resultante se centrifugó a 16.000 x g durante 30 min, y el sobrenadante fue utilizado como extracto crudo. Este método fue el empleado para preparar los extractos utilizados para purificar la NADH-GOGAT.

#### II.B.2.2. Rotura por congelación-descongelación en nitrógeno líquido.

Teniendo en cuenta que las células de *Chlamydomonas* se rompen fácilmente por congelación-descongelación en un tampón apropiado (Fernández y Cárdenas, 1982), se utilizó también este método de rotura. Las células se sumergieron en nitrógeno líquido durante 2 min y se descongelaron posteriormente en presencia de tampón estándar (5 ml por g de peso húmedo de células). La preparación resultante se centrifugó a 16.000 x g durante 30 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo libre de células. Este fue el método utilizado para preparar los extractos que se emplearon para purificar la Fd-GOGAT.

#### II.B.2.3. Rotura por ultravibración con perlas de vidrio

Se mezclaron las células con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm de diámetro, a razón de 1 ml de perlas por cada g de peso húmedo de células, en presencia de tampón estándar (1 ml por cada g de células). La mezcla se homogeneizó suavemente con una varilla de vidrio y se sometió a vibración en un homogeneizador BÜHLER modelo Vi4, durante 4 periodos de 1 min. El material roto se extrajo con tampón estándar a razón de 7 ml por g de peso húmedo de células, y se filtró a través de 4 capas de gasa para retener las perlas de vidrio. El homogenado resultante se centrifugó a 16.000 x g durante 30 min, y se recogió el sobrenadante como extracto crudo libre de células.



Todas las operaciones descritas en los diferentes métodos de rotura se realizaron a 0-4 °C.

## II.C. DETERMINACIONES ANALITICAS

### II.C.1. Proteína

La concentración de proteína se determinó usualmente por el método de Lowry *et al.* (1951). A 0,5 ml de los blancos, estándares o muestras, conteniendo 0 a 100 µg de proteína, se añadieron 2,5 ml de una disolución preparada como sigue: 50 % (V/V) de una disolución de carbonato sódico {4% (P/V) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0,8% (P/V) de NaOH en agua}, 0,5% (V/V) de una disolución al 2 % (P/V) de CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O y 0,5 % (V/V) de una disolución al 4 % (P/V) de tartrato sódico potásico tetrahidrato; se agitó rápidamente y se esperaron 10 min, transcurridos los cuales se adicionaron 0,25 ml del reactivo del fenol de Folin-Ciocalteau. Después de esperar 30 min, se leyó la absorbancia a 750 nm. El coeficiente de extinción del complejo medido fue de 18,2 mg<sup>-1</sup>·ml·cm<sup>-1</sup>.

Para los cálculos de parámetros moleculares, además del método de Lowry, se determinó también la proteína por el método de Bradford (1976), asumiéndose como concentración de proteína la media de los valores obtenidos por ambos métodos. Para la determinación por el método de Bradford se añadió a 0,1 ml de blancos, estándares o muestras conteniendo de 0 a 10 µg de proteína, 1 ml del reactivo de Bradford, preparado como sigue: Se mezclaban 0,01% (P/V) de azul brillante G de Coomassie; 5 % (V/V) de etanol absoluto y 10 % (V/V) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 % (P/V), filtrándose la suspensión resultante para eliminar los grumos no disueltos de colorante. Transcurridos 10 min, se midió la absorbancia a 595 nm del complejo formado con la proteína, que mostró un coeficiente de extinción de 32,6 mg<sup>-1</sup>·ml·cm<sup>-1</sup>.

Como proteína patrón para los dos métodos, se usó una disolución de seroalbúmina al 0,02% (P/V). La concentración de seroalbúmina en los estándares se calculó utilizando el coeficiente de extinción reportado por Rideal y Roberts (1951)  $E_{279} = 0,67 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Para la determinación de proteína en los perfiles de elución de las cromatografías y centrifugaciones en gradiente de densidad de sacarosa, se midió la absorbancia a 280 nm de las distintas fracciones. Cuando las cantidades de proteína eran bajas, se midió la absorbancia a 230 nm. Por este método se detectó la elución de citocromo *c*, anhidrasa carbónica, inhibidor de la tripsina, ovoalbúmina, seroalbúmina, ferritina y ferredoxina. El citocromo *c* también se determinó por su absorción a 409 nm, y la ferredoxina por su absorción a 420 nm.

Para la determinación de proteína en células enteras, se siguió el siguiente tratamiento: 1 ml del cultivo se centrifugó a  $3.000 \times g$  durante 5 min; las células recogidas se resuspendieron en 1 ml de una solución de ácido tricloroacético al 10 % (P/P) y se volvió a centrifugar a baja velocidad. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de NaOH 1 N, y se calentó la suspensión durante 5 min a 60-80 °C. La proteína disuelta se determinó a continuación siguiendo el método de Lowry antes indicado.

### II.C.2. *Clorofila*

La concentración de clorofila se determinó por el método de Arnon (1949) utilizando 1 ml de suspensión de células que se calentaba durante 2 min a 100 °C, y al que posteriormente se añadían 4 ml de acetona comercial. Se centrifugó a  $3.000 \times g$  durante 5 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 652 nm ( $E_{652} = 34,5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### II.C.3. Amonio

Para la determinación de amonio en suspensiones celulares se tomaron alícuotas de 1 ml que se filtraron a través de filtros de 45  $\mu\text{m}$  de diámetro, colocados en un sistema de succión MANIFOLD que estaba acoplado a una bomba de vacío MILLIPORE, recogién<sup>do</sup>se el filtrado, al que se determinó el amonio presente por el método del fenol-hipoclorito descrito por Solorzano (1969). Este método colorimétrico parte de una alícuota de 0,5 ml de los blancos, estándares o muestras conteniendo 20 a 100 nmol de amonio, a la que se añade 1,1 ml de agua destilada; 0,2 ml de fenol al 10 % (P/V) en etanol absoluto; 0,2 ml de nitroprusiato sódico al 0,5 % (P/V) en agua, y 0,5 ml de una solución oxidante, preparada inmediatamente antes de usarla con los siguientes aditamentos: 80 % (V/V) de solución alcalina {20 % (P/V) de citrato trisódico dihidratado y 1 % (P/V) de NaOH, en agua destilada}, que era estable, y 2 % (V/V) de hipoclorito sódico comercial en agua destilada. La mezcla se agita, y tras dos horas en la oscuridad se determina a 640 nm la absorbancia del color desarrollado ( $E_{640} = 16,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , utilizando como patrón una disolución de cloruro amónico, 0,25 mM, en el medio de cultivo descrito en el apartado II.A.2 pero carente de nitrógeno).

### II.C.4. Glutamato

Para la valoración cuantitativa del glutamato formado a expensas de las actividades GOGATs, se siguió básicamente el método de Match *et al.* (1980a). Dicho método consiste en la separación mediante una resina de intercambio iónico del glutamato, para su posterior determinación colorimétrica con ninhidrina, tal y como se describe esquemáticamente en la Fig. 2. Prácticamente se procede así: Se aplican a una columna (1 x 4 cm) empaquetada con 2 ml de una resina intercambiadora de aniones AG 1-X8 (forma acetato, 100-200 mesh), y equilibrada con agua, los 2 ml de la mez-

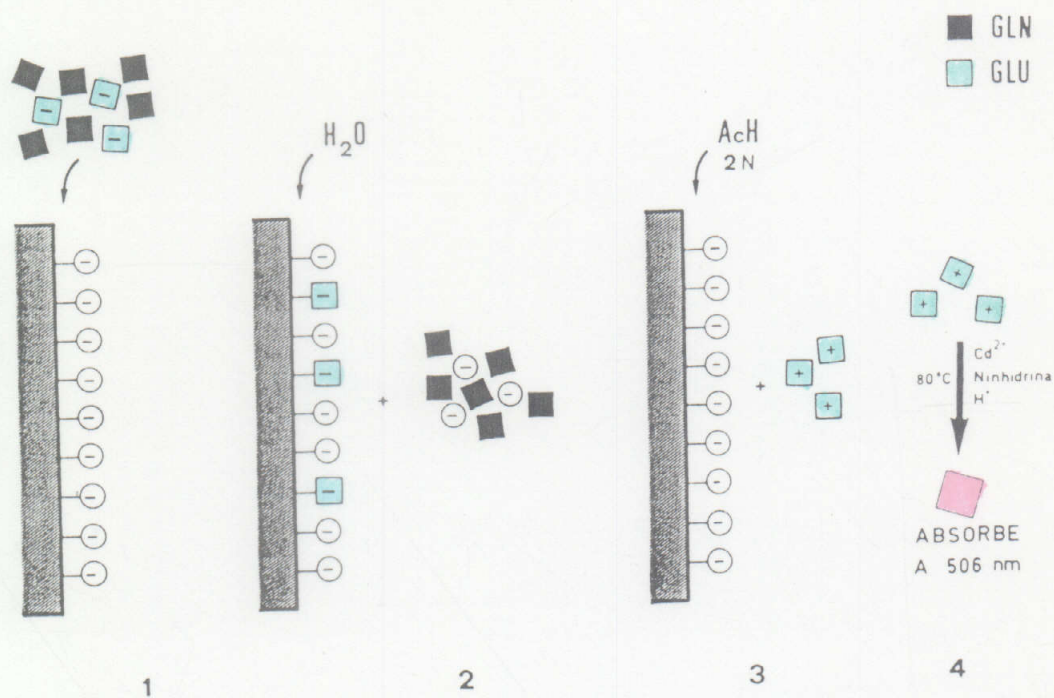


Figura 2. Esquema de la separación de glutamina y glutamato mediante una resina aniónica AG-1-X-8, y posterior valoración del glutamato con ninhidrina.

Cuando se aplica una mezcla de ensayo de actividad GOGAT ( $pH = 7,5$ ), a una columna empaquetada con resina intercambiadora de aniones AG 1-X-8 (1), se verifica el intercambio de las cargas negativas de la resina (en círculos) por el glutamato (en cuadrados blancos) formado, con lo que éste queda retenido en la columna. La glutamina (en cuadrados negros), que no tiene carga a dicho  $pH$ , no queda retenida, eluyéndose al lavar con agua destilada (2). Al aplicar ácido acético 2 N, que disminuye el  $pH$  hasta 2, el glutamato queda con carga parcial positiva, y se eluye de la columna (3). El glutamato presente se determina colorimétricamente a 506 nm (4). Detalles sobre las características del procedimiento se describen en el texto.

cla de reacción. Posteriormente se lava el lecho con 10 ml de agua, y a continuación se eluye el glutamato de la columna lavando con 8 ml de una disolución de acético 2 N.

Si durante la elución se recogen fracciones de 2 ml en las cuales se determina el contenido en aminoácido por la reacción con la ninhidrina (procedimiento que se detalla posteriormente), se obtienen los resultados mostrados en la Fig. 3, donde puede observarse la elución de dos fracciones de aminoácido; una primera que sale completamente después de lavar la columna con 10 ml de agua, y otra segunda, que se recupera al lavar con 8 ml de la disolución de ácido acético. Al someter a una cromatografía en capa fina (apartado II.F.11) las dos fracciones de aminoácido obtenidas, junto con sendos patrones de L-glutamina y L-glutámico, dichas fracciones se identifican, respectivamente, como las correspondientes a glutamina y glutámico (Fig. 4).

El tiempo máximo requerido para el procesamiento por una columna de una mezcla de reacción fue de 10 min, pudiéndose efectuar simultáneamente para 20 ensayos en columnas diferentes.

Una vez separado el glutamato, se procedía a su valoración cuantitativa. Para ello, se tomaba 1 ml de la fracción eluida con acético, al que se añadían 2 ml del reactivo cadmio-ninhidrina, preparado como sigue: 80 ml de etanol; 0,4 g de ninhidrina; 1 g de acetato de cadmio; 10 ml de ácido acético glacial y 20 ml de agua destilada. Se calentaba a 80 °C durante 10 min, y posteriormente se dejaba estabilizar el color formado a 0 °C, midiéndose la absorbancia a 506 nm. El coeficiente de extinción del complejo formado fue  $E_{506} = 6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### II.C.5. *γ*-glutamil hidroxamato

La cantidad de *γ*-glutamil hidroxamato presente como consecuencia de la actividad glutamina sintetasa, se determinó por la reacción del FeCl<sub>3</sub> en medio ácido, según las

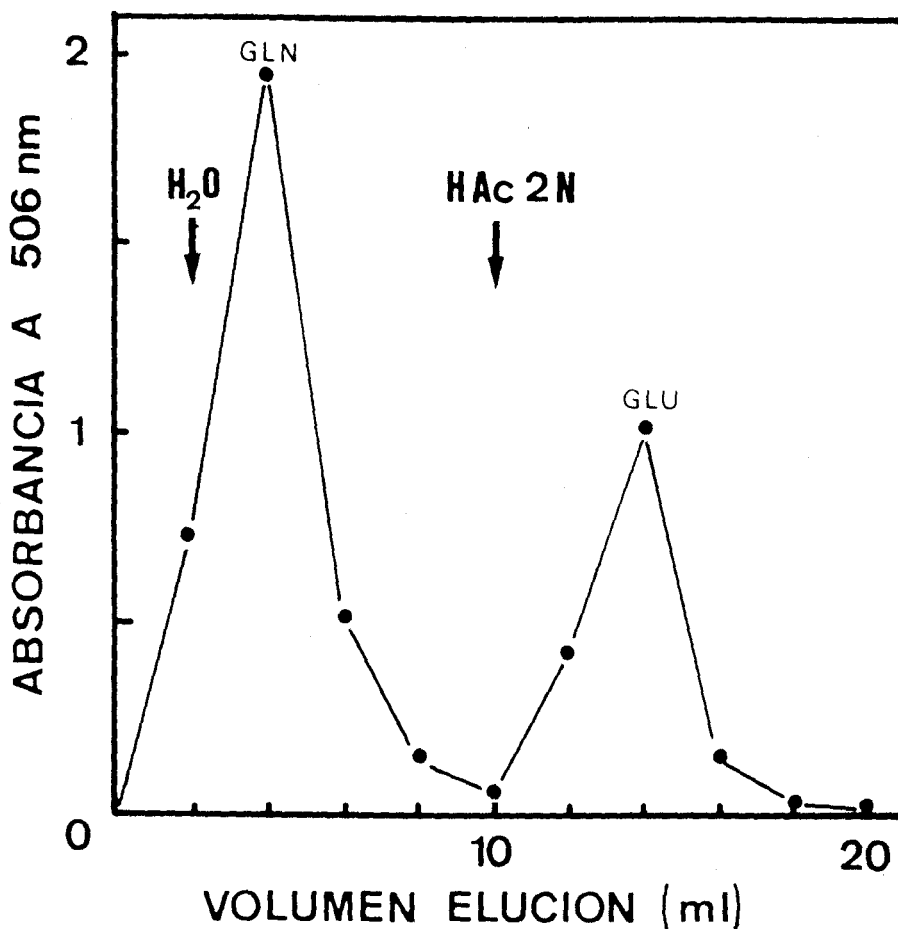


Figura 3. Perfil de elución de un ensayo de actividad GOGAT a través de una resina aniónica AG 1-X-8.

Se aplicaron a la columna 2 ml de un ensayo de actividad MVH-GOGAT, y se procedió como se indica en el texto. Se recogieron fracciones de 2 ml, de las que, en cada caso, se utilizó 1 ml para la reacción con ninhidrina. GLN y GLU, indican las fracciones de máximo contenido en aminoácido, que se utilizaron en los estudios recogidos en la figura siguiente.

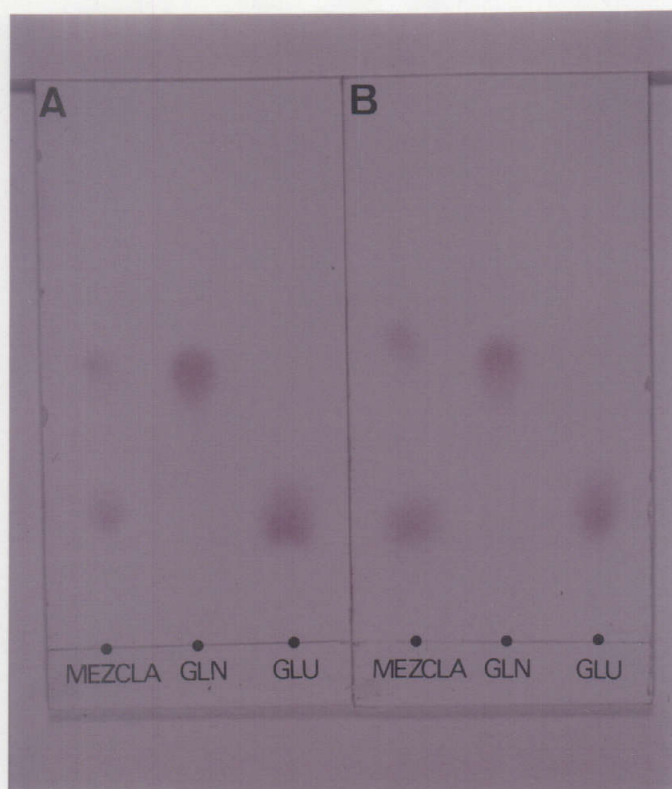


Figura 4. Identificación por cromatografía en capa fina de las fracciones de máximo contenido en aminoácido eluidas de una columna AG 1-X-8.

Se procesaron en cromatografía en capa fina, por el procedimiento indicado en Materiales y Métodos, las fracciones que presentaron máxima absorbancia a 506 nm, del perfil representado en la Fig. 3 (allí se indican respectivamente como GLN y GLU), así como una mezcla de ensayo control, antes de pasar por la resina (A). En B se recoge el resultado de someter al mismo procedimiento L-glutamina y L-glutamato comerciales, y una mezcla de ambos.

condiciones descritas por Shapiro y Stadtman (1970).

A 1 ml de la solución problema, se añadieron 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido, y al cabo de 10 min, el complejo formado se determinó por su absorbancia a 500 nm, utilizando un coeficiente de extinción,  $E_{500} = 1,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . El reactivo ácido de hierro incluía en 1 l de volumen final: 7,7 ml de HCl al 37 % (P/P); 60,2 ml de ácido tricloroacético al 20 % (P/P) y 33,33 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

## II.C.6. *Análisis cuantitativo de grupos prostéticos*

### II.C.6.1. Flavinas

Para determinar el contenido en flavina de la Fd-GOGAT se utilizaron los métodos de Koziol (1971) y de Faeder y Siegel (1973), basados en determinaciones de la intensidad de fluorescencia,  $F$ , la cual es proporcional a la concentración,  $c$ , de las especies fluorescentes:

$$F = K \cdot c$$

de forma que la constante de proporcionalidad,  $K$ , depende de las condiciones experimentales elegidas. Para mezclas de FMN y FAD, la fluorescencia es la suma de las intensidades de fluorescencia correspondientes a cada uno de ambos nucleótidos:

$$F = K_{\text{FMN}} \cdot |\text{FMN}| + K_{\text{FAD}} \cdot |\text{FAD}|$$

Según el método descrito por Koziol (1971), se sometió 1 ml de una preparación purificada de Fd-GOGAT, 5  $\mu\text{M}$ , en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,7, suplementado con EDTA 0,1 mM, a tratamiento con 1 ml de ácido tricloroacético al 20 % (P/P), a 0 °C, en un tubo de centrifuga protegido de la luz con papel de aluminio. Al cabo de 10 min, la preparación se centrifugó a 27.000 x  $g$  durante 15 min, para eliminar la proteína desnaturalizada. Posteriormente, 1 ml del so



brenadante obtenido, se neutralizó inmediatamente con 0,3 ml de  $K_2HPO_4$  4 M, y una segunda alícuota del mismo volumen se neutralizó de la misma forma, pero al cabo de 20 h en la oscuridad a 38 °C, para que tuviese lugar la hidrólisis de todo el FAD existente dando FMN.

Ambas alícuotas se diluyeron con el tampón antes indicado hasta un volumen final de 2,5 ml, determinándose la emisión de fluorescencia a 30 °C de cada muestra y a 530 nm, excitando con luz de 450 nm, en un espectrofluorímetro PERKIN-ELMER, modelo 650-40, equipado con un registrador XY PERKIN-ELMER, modelo HITACHI 057, con una rendija de excitación de 4 nm y una rendija de emisión de 5 nm.

Paralelamente se procesaron una serie de patrones de FAD, entre 5 y 25  $\mu M$  y/o FMN, entre 0,5 y 5  $\mu M$ , cuyas concentraciones se determinaron espectrofotométricamente según Koziol (1971). Las constantes que relacionaban la fluorescencia (en las unidades estándar del aparato de medida) de los patrones con su concentración, fueron de 4,29  $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$  para FAD y 27,69  $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$  para el FMN.

La cantidad total de flavina se calculó a partir de la fluorescencia final obtenida, después de las 20 h de incubación a 38 °C, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$|\text{Flavina total}| (\mu M) = \frac{\text{Fluorescencia final}}{27,69}$$

mientras que las proporciones respectivas de FAD y FMN, se calcularon a partir del dato anterior y de la fluorescencia inicial observada, antes de hidrolizar el FAD, utilizando el siguiente sistema de ecuaciones:

$$|\text{FMN}| + |\text{FAD}| = |\text{Flavina total}|$$

$$27,69 |\text{FMN}| + 4,29 |\text{FAD}| = \text{Fluorescencia inicial}$$

El error relativo cometido al aplicar este método a mezclas de FAD y FMN de concentración conocida, fue de un 7,5 %.

El método de Faeder y Siegel (1973) se aplicó después de extraer el componente flavínico a partir de 0,5 ml de una preparación purificada de Fd-GOGAT, por desnaturalización térmica, lo que se conseguía sumergiendo la preparación enzimática durante 3 min en agua hirviendo. Después, se enfrió rápidamente la muestra a 0 °C, y se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante, que contenía los componentes flavínicos. Este sobrenadante se diluyó con tampón estándar hasta un volumen final de 2,5 ml, y se determinó la intensidad de fluorescencia a 530 nm, excitando con luz de 450 nm, en un espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-5 termostatizado a 30 °C y equipado con un registrador PERKIN-ELMER 561.

A la misma cubeta se le añadieron posteriormente 0,2 ml de HCl al 37 % (P/P), con lo que se conseguía un pH final de 1,7, determinándose de nuevo la intensidad de fluorescencia.

Análogamente se procedió con soluciones estándares de FAD 1 a 5  $\mu\text{M}$ , y FMN 0,1 a 1  $\mu\text{M}$ , de las que se colocaban directamente 2,5 ml en la cubeta del espectrofluorímetro. Las constantes que relacionaban la fluorescencia (en unidades relativas a la fluorescencia, a pH 1,7, del FAD 4,48  $\mu\text{M}$ , que se tomó como 100 %) de los patrones con su concentración fueron, a pH 7,7, 11,43  $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para FAD y 87,50  $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para FMN; y, a pH 1,7, 22,67  $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para FAD y 30,00  $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para FMN.

Con los datos obtenidos, se planteó el siguiente sistema de ecuaciones:

$$F_{7,7} = 11,43 |FAD| + 87,50 |FMN|$$

$$F_{1,7} = 22,67 |FAD| + 30,00 |FMN|$$

donde  $F_{7,7}$  y  $F_{1,7}$  eran las intensidades de fluorescencia respectivas a pH 7,7 y 1,7, de la mezcla de flavín nucleótidos liberados de la enzima. Resolviendo el sistema se podía calcular la cantidad de FMN y FAD de la Fd-GOGAT.

Además de los cálculos fluorimétricos, la flavina total liberada de la enzima también se midió a partir de la absorción de luz visible del componente flavínico extraído de la enzima, bien por desnaturalización térmica o por precipitación en ácido, utilizando los coeficientes de extinción a 375 y 450 nm descritos por Koziol (1971).

#### II.C.6.2. Hierro

Se siguió una modificación del método descrito por Massey (1957), que se basa en la medida de la absorción a 510 nm del complejo de  $Fe^{+2}$  con la *o*-fenantrolina. Primeramente se digiere la proteína hirviéndola en presencia de ácido perclórico y agua oxigenada, para extraer el hierro y tenerlo en disolución. A continuación se neutraliza la disolución con acetato saturado, hasta un pH comprendido entre 5 y 7, que es la zona óptima para la reacción del hierro ferroso con la *o*-fenantrolina. Es preciso reducir el hierro hasta el estado +2, para lo cual se utiliza ascorbato, de forma que tenga lugar el complejo deseado, de color naranja.

Concretamente, en nuestro caso, se procedió así: alícuotas de 0,2 ml conteniendo 25 a 200  $\mu$ g de ferredoxina ó 1 mg de Fd-GOGAT, se digirieron con 50  $\mu$ l de  $HClO_4$  al 70 % (P/P) y 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 30 % (P/P), sumergiéndolas en agua hirviendo durante 30 min. Posteriormente se adicionaron 0,25 ml de una disolución de acetato sódico saturado; 0,2 ml de *o*-fenantrolina al 0,1 % (P/V) y 0,1 ml de ácido ascórbico 30 mM, disuelto en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5. Después de 30 min se midió la absorbancia a 510 nm frente a un blanco de tampón tratado análogamente. Como patrones se utilizaron va

rias muestras que contenían de 0 a 50 nmol de citocromo *c* de corazón de caballo, cuya concentración se determinó en cada caso por medida de la cantidad de proteína ( apartado II.C.1). Los estándares se procesaron exactamente igual que las muestras, obteniéndose un coeficiente de extinción para el complejo hierro-*o*-fenantrolina de  $6,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### II.C.6.3. Sulfuro lábil

Se utilizó el método de King y Morris (1967), con las modificaciones introducidas por Siegel *et al.* (1973). Este método se basa en la adsorción del ácido sulfhídrico en una suspensión conteniendo hidróxido sódico y acetato de cinc. El sulfuro de cinc formado se une a la *p*-aminodimetil anilina (N,N'-dimetil-*p*-feniléndiamina) en solución ácida, y en presencia de cloruro férrico, dando presumiblemente azul de metileno que se determina fotométricamente por su absorción a 670 nm.

Alícuotas de 0,7 ml conteniendo los estándares (entre 50 y 300  $\mu\text{g}$  de ferredoxina de *Chlamydomonas*), o las muestras con 0,5 a 0,7 mg de Fd-GOGAT en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, se trataron con el reactivo de cinc alcalino recién preparado mezclando 5 volúmenes de acetato de cinc al 2,6 % (P/V) con 1 volumen de NaOH al 6 % (P/V). Se taparon los tubos y se dejaron a temperatura ambiente con agitación continua. Al cabo de 2 h se añadió a cada tubo 0,1 ml de sulfato de N,N'-dimetil-*p*-feniléndiamina 0,02 M, preparado en HCl 7,2 N, seguido por 0,1 ml de FeCl<sub>3</sub> 0,03 M, preparado en HCl 1,2 N. Después de 20 min a temperatura ambiente, se centrifugó a  $15.000 \times g$  durante 15 min para eliminar la turbidez, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 670 nm, frente a un blanco con tampón preparado en las mismas condiciones.

El coeficiente de extinción utilizado para el cálculo del sulfuro lábil de la ferredoxina fue  $E_{670} = 31,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

El cálculo del sulfuro lábil de la Fd-GOGAT se estableció a partir de una recta de calibrado con ferredoxina, asumiendo la presencia de 2 mol de sulfuro por mol de ferredoxina.

#### II.C.7. *Análisis de aminoácidos de la ferredoxina*

Muestras de 30  $\mu$ l conteniendo 0,15 mg de ferredoxina, se hidrolizaron a 115  $^{\circ}$ C durante 24, 48 y 72 h, con 1,5 ml de ácido metanosulfónico 4 M conteniendo 3-(2-aminoetil)indol al 0,2 % (P/V) en ampollas cerradas a vacío.

Los análisis se llevaron a cabo con un autoanalizador CHROMASPECK-J-180, utilizando 0,3 ml de las preparaciones anteriores, a los que se añadieron 0,3 ml de *norleucina* 40  $\mu$ M, disuelta en LiOH 3,5 N, empleada como estándar interno. Como reactivo fluorigénico se utilizó el *o*-ftaldehído.

El contenido en treonina, serina y alanina, se calculó por extrapolación a tiempo cero de los valores obtenidos. El contenido en valina, metionina, isoleucina y fenilalanina, se obtuvo a partir de los valores medios a las 48 y 72 h de hidrólisis. El contenido en triptófano se determinó espectrofotométricamente por el método de Edelhoeh (1967). Para otros aminoácidos se consideraron los valores medios de los obtenidos en los diferentes tiempos de hidrólisis. El número de residuos de aminoácido por molécula de ferredoxina así como su peso molecular mínimo, se calcularon por el procedimiento de Thornber y Olson (1967).

#### II.D. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Las actividades enzimáticas se han medido, según los casos, *in situ*, utilizando una suspensión de células permeabilizadas, o *in vitro*, con los extractos descritos en el apartado II.B. Para las determinaciones *in situ*, 5-10 ml del

cultivo de *Chlamydomonas*, se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min, y se lavaron y resuspendieron en 1 ml de tampón morfolinopropano sulfónico (MOPS) 50 mM, pH 7,0, para las medidas de GS, y 0,5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, para las actividades GOGAT. A esta suspensión celular se añadieron 25 µl de tolueno comercial y, tras agitar vigorosamente durante 1 min, se conseguía la permeabilización de las células. A esta preparación de células tolueñizadas se añadían los reactivos de los ensayos enzimáticos respectivos, tal y como se describe a continuación.

#### II.D.1. *NADH-glutamato sintasa*

Esta actividad se determinó básicamente por dos procedimientos:

a) Valoración colorimétrica del glutamato formado.

La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 2 ml, 200 µmol de fosfato potásico, pH 7,5, 10 µmol de L-glutamina, 10 µmol de 2-oxoglutarato, 10 µmol de aminooxiacetato, 0,5 ml de preparación enzimática y 3 µmol de NADH. El ensayo se mantenía 20 min a 30 °C, transcurridos los cuales se paraba hirviendo durante 1 min. Las soluciones así obtenidas se mantenían a 0 °C hasta ser utilizadas para determinar colorimétricamente el glutamato formado (apartado II.C.4 ).

b) Valoración espectrofotométrica del NADH desaparecido.

Este procedimiento consistía en medir espectrofotométricamente, a 340 nm, la oxidación del NADH que acompaña a la formación del glutamato. En cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, se prepararon las mezclas de ensayo que contenían, en un volumen final de 1 ml: 100 µmol de tampón fosfato potásico, pH 7,5, 5 µmol de L-glutamina, 5 µmol de 2-oxoglutarato, y 0,15 µmol de NADH, así como una adecuada cantidad de enzima capaz de catalizar un cambio de absorbancia de 0,05 a 0,3 por min. Este procedimiento se utilizó solamente con

preparaciones de enzima parcialmente purificadas.

Una unidad de actividad expresa, para ambos procedimientos, la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de glutamato por min.

#### II.D.2. *NADH-ferricianuro reductasa*

Se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la velocidad de oxidación del NADH, a 340 nm, en una mezcla que contenía, en 1 ml de volumen final, 100  $\mu\text{mol}$  de tampón fosfato potásico, pH 7,5, 1  $\mu\text{mol}$  de ferricianuro potásico, 0,15  $\mu\text{mol}$  de NADH y la adecuada cantidad de enzima, que provocaba un cambio de absorbancia de 0,1 a 0,6 por min. A la velocidad de oxidación del NADH que producía la enzima, se restaba la oxidación química que tenía lugar en ausencia de la misma.

Una unidad de actividad es la cantidad de enzima requerida para la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por min.

#### II.D.3. *Fd-glutamato sintasa*

Se determinó colorimétricamente midiendo el glutamato formado durante la reacción, que utilizaba como donador de electrones, ferredoxina reducida químicamente con ditionito. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml: 200  $\mu\text{mol}$  de fosfato potásico, pH 7,5, 10  $\mu\text{mol}$  de L-glutamina, 10  $\mu\text{mol}$  de 2-oxoglutarato (sal disódica), 10  $\mu\text{mol}$  de aminoacetato, 0,15 mg de ferredoxina purificada (apartado II. E.2.), 23  $\mu\text{mol}$  de ditionito sódico (de una disolución recién preparada disolviendo el ditionito en  $\text{NaHCO}_3$ , 0,2 M), y la adecuada cantidad de enzima.

Después de incubar 20 min a 30  $^{\circ}\text{C}$ , se paró la reacción sumergiendo el tubo que contenía la mezcla en agua hirviendo durante 1 min, y posterior agitación vigorosa hasta eliminar el exceso de poder reductor. A continuación, la mez-

cla de reacción se mantenía en hielo hasta que se procedía con ella según se indica en el apartado II.C.4 para separar el glutamato formado y valorarlo colorimétricamente con ninhidrina. Como control se procesó paralelamente una mezcla de reacción carente exclusivamente de poder reductor, restándose el glutamato presente en ella del que tenía la muestra, con lo que se determinaba solamente el glutamato formado a expensas de la actividad GOGAT.

Una unidad de actividad expresa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de glutamato por min, en las condiciones descritas.

#### II.D.4. *MVH-glutamato sintasa*

Se determinó colorimétricamente por un procedimiento similar al descrito para la Fd-glutamato sintasa, pero adicionando 20  $\mu\text{mol}$  de metil viológeno a la mezcla de ensayo, en vez de ferredoxina.

#### II.D.5. *Glutamina sintetasa*

Se determinó mediante el ensayo de la actividad transferasa, según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970), midiendo el  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado. El ensayo se hacía *in situ*, con una mezcla de reacción que incluía, en un volumen final de 2 ml, los siguientes aditamentos: 50  $\mu\text{mol}$  de tampón morfolinopropano sulfónico (MOPS), pH 7,0; 30  $\mu\text{mol}$  de glutamina; 3  $\mu\text{mol}$  de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4  $\mu\text{mol}$  de ADP (forma disódica); 60  $\mu\text{mol}$  de cloruro de hidroxilamonio; 60  $\mu\text{mol}$  de NaOH; 20  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ; 5  $\mu\text{mol}$  de DTE y 1 ml de la suspensión de células toluenizadas.

La reacción se iniciaba por la adición del biarseniato; se desarrollaba durante 10 min a 30  $^{\circ}\text{C}$ , y se paraba por la adición de 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido, de terminándose el  $\gamma$ -glutamil hidroxamato según se indicó en el apartado II.C.5 .



#### II.D.6. *Catalasa*

La actividad catalasa se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm, resultante de la descomposición del agua oxigenada (Lück, 1963). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml : 18  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 45  $\mu\text{mol}$  de tampón fosfato potásico (pH 7,5), además de la adecuada cantidad de enzima. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de cuarzo de 1 cm de paso de luz, a temperatura ambiente.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1  $\mu\text{mol}$  de agua oxigenada por min.

#### II.D.7. *Alcohol deshidrogenasa*

La actividad alcohol deshidrogenasa se ensayó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm, debido al NADH formado por oxidación del etanol (Bergmeyer *et al.*, 1974).

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 126  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 126  $\mu\text{mol}$  de hidrocloreuro de semicarbazida; 37,5  $\mu\text{mol}$  de tampón glicina-NaOH (pH 8,8), 0,9 mmol de etanol y 1,5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$ , además de la adecuada cantidad de enzima.

La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, a temperatura ambiente.

Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por min.

## II.E. PURIFICACION DE PROTEINAS

La purificación de las distintas proteínas estudiadas en esta Tesis, se llevó a cabo a 0-4 °C a partir de los extractos crudos de *C.reinhardtii* obtenidos como se menciona en el apartado II.B.

### II.E.1. Purificación de la NADH-glutamato sintasa

El procedimiento de purificación consistió en los siguientes pasos:

#### 1) Tratamiento con sulfato de protamina

Se añadió al extracto crudo una solución al 2 % (P/V) de sulfato de protamina, ajustado a pH 7,5 con KOH, en la proporción de 1 ml por cada 10 ml de extracto. Después de 5 a 10 min de agitación suave, la suspensión se centrifugó a 16.000 x *g* durante 30 min, y el sobrenadante fue utilizado para la purificación posterior de la enzima.

#### 2) Cromatografía en DEAE-Sefacel

La preparación enzimática obtenida tras el tratamiento con protamina, se adsorbió en una columna (2,8 x 23 cm) de DEAE-Sefacel equilibrada con tampón estándar. Se lavó la columna con una cantidad de tampón equivalente al volumen de lecho, y se eluyó la actividad, a un flujo de 40 ml·h<sup>-1</sup>, con 500 ml de un gradiente lineal desde 0 hasta 0,3 M de NaCl.

#### 3) Cromatografía en Cibacrón-Sefarosa

La preparación enzimática se pasó a través de una columna (17 x 80 mm) de Cibacrón-Sefarosa equilibrada con tampón estándar. Se lavó la columna con una cantidad de tampón equivalente al volumen de lecho y a continuación se aplicaron 50 ml de un gradiente de fosfato potásico de pH 7,5, desde 10 hasta 100 mM, suplementado con 0,2 mM de DTE y 0,5 mM de EDTA. El flujo utilizado fue de 15 ml·h<sup>-1</sup>.

#### 4) Cromatografía en Biogel

La preparación enzimática obtenida del paso anterior, después de ser concentrada por ultrafiltración, se filtró a través de una columna (1,6 x 70 cm) de Biogel A-1.5 m, equilibrada en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, con teniendo 0,2 mM de DTE y 0,5 mM de EDTA. El flujo utilizado en esta cromatografía fue de  $20 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### II.E.2. *Purificación de la ferredoxina*

La purificación de ferredoxina se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

#### 1) Tratamiento con sulfato de protamina

Se llevó a cabo según hemos mencionado para la purificación de la NADH-GOGAT (apartado II.E.1 ).

#### 2) Primera cromatografía en DEAE-Sefacel

El sobrenadante resultante del tratamiento con protamina, se pasó a través de una columna (2,6 x 78 cm) de DEAE-Sefacel equilibrada con tampón estándar. Después de lavar la columna con 1 l de gradiente 0-0,3 M de NaCl disuelto en el mismo tampón, se eluyó la ferredoxina con NaCl 0,5 M, disuelto en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, recogiéndose fracciones de 10 ml.

#### 3) Segunda cromatografía en DEAE-Sefacel

Las fracciones del paso anterior que contenían ferredoxina, se juntaron, se diluyeron 5 veces con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, y se pasaron a través de una segunda columna (2 x 20 cm) de DEAE-Sefacel equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar con 200 ml de tampón conteniendo 0,2 M de NaCl, se eluyó la ferredoxina con 300 ml de un gradiente lineal 0,2 a 0,7 M de NaCl en el tampón, recogiéndose fracciones de 5 ml. Las fracciones con ferredoxina se juntaron y se dializaron durante una noche frente a 5 l de tampón fosfato 50 mM, pH 7,5.

Cuando se requirió ferredoxina muy concentrada, la preparación purificada se pasó a través de una columna (1 x 8 cm) de DEAE-Sefacel, y se eluyó con NaCl 0,5 M en tampón, dializándose después en las mismas condiciones descritas anteriormente.

### II.E.3. *Purificación de la Fd-glutamato sintasa*

La Fd-GOGAT se purificó mediante los siguientes pasos:

#### 1) Tratamiento con sulfato de protamina

Se llevó a cabo según hemos mencionado para la purificación de la NADH-GOGAT (apartado II.E.1 ).

#### 2) Primera cromatografía en DEAE-Sefacel

La preparación obtenida del paso anterior se pasó a 100 ml·h<sup>-1</sup> a través de una columna (2,6 x 78 cm) de DEAE-Sefacel equilibrada con el tampón estándar. Después de lavar la columna con 200 ml de tampón, se eluyó la actividad GOGAT con 1 l de un gradiente lineal 0-0,3 M de NaCl disuelto en el tampón de lavado, recogiendo fracciones de 10 ml.

#### 3) Segunda cromatografía en DEAE-Sefacel

Se juntaron las fracciones de la cromatografía anterior que presentaban actividad, y se diluyó 4 veces con tampón estándar para pasar a través de una segunda columna (3 x 44 cm) de DEAE-Sefacel, a un flujo de 100 ml·h<sup>-1</sup>. De esta columna se eluyó la Fd-GOGAT en fracciones de 8 ml mediante 800 ml de un gradiente lineal, 0-0,3 M, de NaCl.

#### 4) Cromatografía en hidroxilapatito

Las fracciones activas del paso anterior se concentraron por precipitación con sulfato amónico al 70 % (P/V) (apartado II.F.12.1 ), seguido de diálisis frente a tampón estándar. La preparación resultante se adsorbió en una co

lumna (2 x 20 cm) de hidroxilapatito, equilibrada con tampón estándar. Se lavó la columna, de forma discontinua, con diferentes tampones conteniendo concentraciones crecientes de fosfato, en la siguiente forma: primero con 200 ml de tampón estándar; luego, con 200 ml de fosfato 50 mM, pH 7,5, conteniendo 0,5 mM de EDTA y 0,2 mM de DTE; y, finalmente, con 200 ml de fosfato 100 mM, conteniendo también DTE y EDTA. Durante la cromatografía se recogieron fracciones de 3 ml, a un flujo de  $25 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ .

#### 5) Cromatografía en Fd-Sefarosa

Las fracciones activas del paso anterior se juntaron y se concentraron por ultrafiltración (apartado II.F.12.2), y se dializaron frente a tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,0, conteniendo EDTA 0,5 mM y DTE 0,2 mM. La preparación resultante se aplicó a una columna (1,8 x 5,5 cm) de Fd-Sefarosa equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar con 30 ml de tampón, la actividad GOGAT se eluyó con 100 ml de un gradiente lineal de NaCl, 0-0,2 M, recogiéndo fracciones de 2 ml a un flujo de  $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ .

## II.F. TECNICAS EXPERIMENTALES

### II.F.1. *Centrifugaciones*

Las centrifugaciones a baja velocidad, menos de  $5.000 \times g$ , se realizaron a temperatura ambiente en centrífugas HERAEUS, modelo Labofuge.

Para centrifugaciones superiores a  $5.000 \times g$ , se empleó una centrífuga refrigerada: SORVALL, modelo RC-5-B, equipada con los rotores GSA ó SS34, según se tratara de volúmenes superiores o inferiores, respectivamente, a 200 ml.

## II.F.2. *Determinación del coeficiente de sedimentación por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa*

Los coeficientes de sedimentación se determinaron por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, de acuerdo con el procedimiento descrito por Martin y Ames (1961).

Para la Fd- y NADH- GOGAT, cada tubo de centrífuga contenía 4,6 ml de un gradiente lineal de sacarosa desde el 5 % (P/V) en la parte superior del tubo, hasta el 20 % (P/V) en el fondo, preparado en tampón estándar. Para la formación del gradiente se empleó un aparato mezclador BUCHLER de dos compartimentos.

Se aplicaron muestras de 0,15 ml conteniendo la Fd-GOGAT (1,3 U), la NADH-GOGAT (0,2 U), o las proteínas patrones en la parte superior de cada tubo, encima del gradiente.

La centrifugación se llevó a cabo a 50.000 r.p.m. durante 14 h para la Fd-GOGAT, y durante 7 h para la NADH-GOGAT, en una ultracentrífuga refrigerada BECKMAN SPINCO L2-65 B, equipada con el rotor SW-65 K.

Para la ferredoxina, cada tubo contenía un gradiente lineal de sacarosa desde el 5 % (P/V) en la parte superior hasta un 12 % (P/V) en la parte inferior, y sobre ellos se aplicaban muestras de 0,1 ml conteniendo 1,5 mg de ferredoxina o las proteínas patrones.

La centrifugación se llevó a cabo en una ultracentrífuga BECKMAN L5-50 con un rotor SW-50.1 Ti, a 43.000 r.p.m., durante 19 h.

Después de las respectivas centrifugaciones, los gradientes se eluyeron a un flujo de  $9 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ , empezando por el fondo del tubo, mediante un aparato Densi-flow de BUCH

LER. Se recogieron 33-34 fracciones de 3 gotas cada una.

Las proteínas patrones utilizadas fueron, para el caso de la Fd-GOGAT, citocromo *c* (250  $\mu$ g por gradiente), ovoalbúmina (375  $\mu$ g), alcohol deshidrogenasa (12 U), y catalasa (655 U); para la NADH-GOGAT, ovoalbúmina (500  $\mu$ g), alcohol deshidrogenasa (15 U), y catalasa (650 U); para la ferredoxina, citocromo *c* (1 mg), ovoalbúmina (1 mg) y anhidrasa carbónica (1 mg).

### II.F.3. *Determinación del radio de Stokes por filtración en gel*

El radio de Stokes de las diferentes proteínas estudiadas se estimó por filtración en gel, siguiendo el método de Siegel y Monty (1966).

Para la NADH-GOGAT se utilizó una columna (2,6 x 76 cm) de Bio-Gel A-1,5 m, equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, suplementado con 0,5 mM de EDTA, 0,2 mM de DTE y 20  $\mu$ M de FAD. La solución de NADH-GOGAT y las de las proteínas patrones se prepararon en el tampón antes citado y se suplementaron con sacarosa al 6 % (P/V). Se tomaron muestras de 2,5 ml, conteniendo 4,6 U de NADH-GOGAT, o las proteínas patrones (ovoalbúmina, 3 mg; seroalbúmina, 3 mg; alcohol deshidrogenasa, 60 U; catalasa, 6000 U; ferritina, 6 mg), que se aplicaron con una jeringa en la parte superior del gel, y se realizó la elución a un flujo de 30 ml·h<sup>-1</sup>, recogiendo fracciones de 2 ml. El volumen vacío de la columna,  $V_0 = 162$  ml, se determinó a partir del volumen de elución de una muestra conteniendo azul-dextrano al 0,3 % (P/V) y procesada en idénticas condiciones. El volumen total (asumido como el volumen de la fase estacionaria o volumen interno, que se corresponde con el volumen de solvente accesible a las distintas proteínas),  $V_t = 416$  ml, se determinó por el volumen de elución de una muestra conteniendo ferricianuro al 0,2 % (P/V).

Para la ferredoxina, se utilizó una columna (1,5 x 21 cm) de Sephadex G-75, equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Se aplicaron muestras de 0,5 ml conteniendo 0,7 mg de ferredoxina y/o los estándares (citocromo *c*, 1 mg; inhibidor de tripsina, 1 mg y ovoalbúmina, 1 mg) en la parte superior del gel, recogiendo fracciones de 0,5 ml. El volumen vacío,  $V_o=10,6$  ml, y el volumen total,  $V_t=26,6$  ml, se determinaron como se ha mencionado para la NADH-GOGAT.

Para la determinación del radio de Stokes de la Fd-GOGAT, se utilizó una columna (1,6 x 70 cm) de Bio-Gel A-1,5 m, equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, suplementado con EDTA 0,5 mM y DTE 0,2 mM. Se tomaron muestras de 0,3 ml conteniendo 2,3 U de Fd-GOGAT ó las proteínas patrones (ovoalbúmina, 1 mg; seroalbúmina, 1 mg; alcohol deshidrogenasa, 1 U; catalasa 30 U, y ferritina, 2 mg), que se aplicaron a la columna, realizándose la elución en fracciones de 1,45 ml, a un flujo de  $20 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

En todos los casos se calculó, para cada una de las proteínas estudiadas y de sus correspondientes patrones, el valor de la constante de partición  $K_d$ , que equivale a

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde  $V_e$  es el volumen de elución de la proteína en cuestión.

Para determinar los radios de Stokes deseados, se representaron los datos de  $K_d^{1/3}$  frente a los radios conocidos de las proteínas patrones.



## II.F.4. *Electroforesis*

### II.F.4.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas con carácter analítico se realizaron en geles de poliacrilamida, usando el sistema discontinuo de gel de Jovin *et al.* (1964).

El tampón electrolito (pH 8,3), estaba constituido por Tris ( $3,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y glicina ( $15,28 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mientras que el tampón de los geles era Tris-HCl 3 M (pH 8,82) conteniendo TEMED al 0,46 % (V/V).

Para la preparación de los geles se mezclaban, inmediatamente antes de usar: 1 volumen de tampón de gel; el volumen adecuado de una solución de acrilamida al 20 % (P/V) y bis-acrilamida al 0,8 % (P/V) en agua, de forma que quedara en los geles la concentración final de acrilamida deseada, y 4 volúmenes de una solución de persulfato amónico  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Después de eliminar los gases disueltos mediante succión con una bomba MILLIPORE, los geles se dejaron polimerizar en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 14 cm de longitud, que se rellenaron con la mezcla hasta aproximadamente 2 cm del extremo superior, cubriendo el menisco con una capa de agua de 2-3 mm.

Las muestras (10-50  $\mu\text{l}$ ), conteniendo 10-50  $\mu\text{g}$  de proteína, sacarosa al 10 % (P/V) y azul de bromofenol al 0,01 % (P/V), se aplicaban a los geles, tras lo cual se realizaba la electroforesis, primero a 1-2 mA por gel, durante 20 min, y después a 3-4 mA por gel hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el extremo inferior del gel (aproximadamente 2 h).

El proceso electroforético se realizó en un aparato para 20 geles de Pharmacia, con una fuente de alimentación ATOM, modelo 502.

#### II.F.4.2. Localización de las proteínas en los geles de electroforesis

Una vez concluída la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 al 1 % (P/V) en ácido acético al 7 % (V/V). Tras 3-4 h de tinción, los geles se lavaron repetidas veces con una mezcla de metanol al 5 % (V/V) y ácido acético al 7 % (V/V), permaneciendo las bandas de proteína teñidas de azul mientras que el resto del gel se había decolorado.

#### II.F.4.3. Localización de la actividad NADH-diaforasa en los geles de electroforesis

Las proteínas con actividad diaforasa se identificaron en los geles siguiendo el método descrito por Wang y Raper (1970).

Los geles se sumergieron en una disolución de cloruro de *p*-nitroazul de tetrazolio al 0,05 % (P/V) y NADH al 0,05 % (P/V) en tampón fosfato 0,5 M, pH 7,5.

Tras 0,5 h en la oscuridad, aparecieron las bandas de actividad diaforasa. Entonces, se lavó el gel con agua y se conservó en ácido acético al 7 % (V/V).

#### II.F.4.4. Electroforesis en presencia de SDS

La electroforesis en SDS se llevó a cabo según el procedimiento de Weber y Osborn (1969), usando geles al 5 % (P/V) de acrilamida. El tampón de los geles era fosfato sódico 0,2 M, pH 7,5, ( $7,80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $51,56 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ), conteniendo SDS al 0,2 % (P/V). El tampón electrolito se preparó diluyendo a la mitad con agua el tampón de los geles.

Para preparar los geles, se mezclaron 6,5 ml de una solución compuesta por acrilamida al 22,2 % (P/V) y bis-acrilamida al 0,6 % (P/V), con 6,5 ml de agua, 15 ml del tampón de los geles, 1,5 ml de persulfato amónico  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  y 45  $\mu\text{l}$  de TEMED. Después de eliminar los gases disueltos, se dejó polimerizar en tubos de 5 mm de diámetro interno y 14 cm de longitud, llenándolos hasta 2 cm del extremo superior y cubriendo el menisco con una capa de agua de 2-3 mm.

Para las distintas electroforesis, se tomaron muestras de 0,2 ml, conteniendo 0,1 a 0,2 mg de proteína, a las que se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, conteniendo SDS al 10 % (P/V) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10 % (V/V). Se calentó durante 5 min a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , y se añadió sacarosa al 10 % (P/V) y azul de bromofenol al 0,01 % (P/V). De estas preparaciones se aplicaban a cada gel 20  $\mu\text{l}$ .

Como proteínas patrones se usaron dos conjuntos de proteínas marcadoras suministrados por BIO-RAD, conteniendo ovoalbúmina, seroalbúmina, fosforilasa *b*,  $\beta$ -galactosidasa y miosina, para el caso de la electroforesis de la Fd-GOGAT, y citocromo *c*, lisozima, inhibidor de la tripsina, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, seroalbúmina y fosforilasa *b*, para la ferredoxina. Con los patrones se procedió igual que con las muestras, partiendo de la solución comercial diluída 20 veces con tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5.

A cada gel de electroforesis se aplicaban 2 a 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína estándar.

La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, primero a 5 mA por gel durante 30 min, y después a 10 mA por gel hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el extremo final del gel (aproximadamente 8 h). El aparato empleado y el procedimiento de localización de las proteínas fueron los mismos que los mencionados anteriormente.

## II.F.5. *Determinación del punto isoeléctrico por electroenfoque*

El isoelectroenfoque efectuado para determinar el punto isoeléctrico de la ferredoxina, se llevó a cabo a 4 °C en geles al 4,5 % de poliacrilamida, conteniendo anfolina al 1 % (P/V), que establecía un gradiente de pH desde 3,5 hasta 10 a lo largo del gel, según el procedimiento descrito por Maurer (1971), por electroforesis vertical con una cubeta SHANDON acoplada a una fuente de alimentación ATOM 500.

Las soluciones electrodo eran: cátodo, KOH al 0,4 % (P/V); ánodo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0,2 % (P/V).

La corriente inicial se ajustó ocasionalmente hasta que se hizo estable (2 mA por gel). Después de 3 h, los geles se trocearon en porciones de 0,5 cm, que se machacaron en 1 ml de agua destilada y se incubaron así toda la noche. A cada fracción se le determinó el pH. La banda de ferredoxina (50 µg) se localizó directamente en el gel por su color marrón.

## II.F.6. *Determinaciones espectrofotométricas*

Las medidas de absorbancia, cinéticas enzimáticas y espectros de absorción, se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro BAUSCH & LOMB, modelo Spectronic 2.000, de doble haz, ultravioleta-visible, dotado de lectura digital y de registrador XY de gráficos. Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo, para medidas a longitudes de onda inferiores a 340 nm y espectros, y de cristal o plástico para las demás. En todos los casos el paso de luz fue de 1 cm.

Los densitogramas realizados a los geles después de las electroforesis, se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP8-100 UV, equipado con un densitómetro modelo 790826. Los geles, una vez teñidos, se colocaron en un tubo

de vidrio de 5 mm de diámetro interno, midiéndose la absorbancia a 640 nm a lo largo del gel. Los geles se desplazaban a una velocidad de  $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### II.F.7. *Determinaciones espectrofluorimétricas*

Los estudios fluorimétricos se realizaron en espectrofluorímetros PERKIN-ELMER, modelos LS-5 y 650-40, equipados respectivamente con registradores PERKIN-ELMER 561 e HITACHI 057, termostatizados a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Teniendo en cuenta que todas las determinaciones fluorimétricas se centraron sobre el estudio de la flavina, siempre se usó como longitud de onda de excitación 450 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron desde la longitud de onda de excitación hasta 650 nm. Las medidas de fluorescencia a longitud de onda fija, se realizaron a 530 nm, máximo de emisión de los flavín nucleótidos.

#### II.F.8. *Titulaciones potenciométricas*

La determinación del potencial normal de la ferredoxina se efectuó según la técnica propuesta por Dutton y Wilson (1974) en cubetas anaeróbicas de cuarzo y a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , usando un espectrofotómetro AMINCO, modelo DW-2a<sup>TM</sup>, de doble longitud de onda, equipado con un agitador magnético acoplado al portacubetas para la mezcla de los reactivos añadidos durante el experimento.

El potencial redox se medía simultáneamente con un electrodo combinado Pt-Ag/AgCl INGOLD ( $E_0 = + 222 \text{ mV}$ ), conectado a un potenciómetro BECKMAN, modelo 4 500. El electrodo se calibraba antes de la titulación con una solución saturada de quinhidrona, a pH 7,0 ( $E_0 = + 280 \text{ mV}$ ).

A través de la cubeta, conteniendo 3 ml de una solución de ferredoxina, se hizo pasar una corriente de N<sub>2</sub> antes de empezar la titulación, y durante todo el tiempo que duró la misma. El N<sub>2</sub> se hacía pasar previamente a través de una disolución de pirogalol en NaOH al 1 % (P/V), para eliminar las trazas de oxígeno que pudiera llevar el gas.

Se medían los cambios de absorbancia a 420 nm, a la vez que el potencial redox, después de añadir distintas alícuotas de una disolución de ditionito sódico 20 mM, preparada anaerómicamente en tampón bicarbonato 0,5 M, pH 8,3. Los mediadores redox usados fueron: bencil viológeno 2 μM (E'₀, pH 7,0, = -360 mV) y metil viológeno 2 μM (E'₀, pH 7,0, = -440 mV).

#### II.F.9. Resonancia paramagnética del electrón (EPR)

Los espectros de EPR se registraron en un aparato BRUKER, modelo ER 200 tt, equipado con un computador NICOLETTE, modelo 1180, para muestras que contenían un volumen final de 0,20 ml y que habían sido congeladas cuidadosamente en nitrógeno líquido, antes de ser procesadas. En los espectros obtenidos se representa siempre una función arbitraria de la primera derivada de la absorción de microondas (en ordenadas) frente al campo magnético aplicado (en abscisas).

Los valores de  $g$  de las distintas señales obtenidas se calcularon utilizando la siguiente expresión:

$$g = 714,45 \cdot \frac{\nu}{H}$$

siendo  $\nu$  la frecuencia de microondas, expresada en gigahertzios, y  $H$ , la intensidad del campo magnético, en gauss.

## II.F.10. Preparación de la columna de ferredoxina-Sefarosa

El gel de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (7 g) se colocó sobre la placa porosa de un filtro y se lavó primero con 100 ml de HCl 1 mM, y después con 100 ml de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. A continuación se resuspendió el gel en 35 ml de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM (pH 8,3), y se añadieron 25 mg de ferredoxina purificada, disuelta en 3 ml de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. La mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante la noche, para que tuviera lugar el acoplamiento de la ferredoxina a la Sefarosa. Después de filtrar y lavar con el mismo tampón, se trató el gel con tampón Tris-HCl 1 M, pH 8,0, durante 2 h, a temperatura ambiente, para bloquear los grupos activos remanentes en la Sefarosa. A continuación, se lavó el gel con tampón estándar para su utilización en la purificación de la Fd-GOGAT.

El rendimiento obtenido en el acoplamiento fue del 84% (3 mg de ferredoxina acoplada por cada ml de gel)

## II.F.11. Cromatografía en capa fina

Se realizó en placas de 5 x 20 cm con soporte de gel de sílice (Merck), con un desarrollo ascendente durante 3 h, utilizando como disolvente una mezcla de fenol y agua en proporción 3:1 (P/P). De las distintas alícuotas se realizaban 10 aplicaciones, por término medio, utilizando para ello un capilar muy fino.

La localización en la placa de cromatografía de las manchas de aminoácidos, se hizo, una vez desarrollada la cromatografía y secada la placa, pulverizando una solución de ninhidrina al 0,2 %, disuelta en alcohol etílico (P/V), y calentando a 100 °C en una estufa hasta aparecer las manchas de color rosa.

## II.F.12. *Técnicas de concentración de proteínas*

### II.F.12.1. Precipitación con sulfato amónico

A la preparación enzimática se añadió, a 0-4 °C, poco a poco y con agitación continua, sulfato amónico sólido, finamente triturado con un molinillo, hasta conseguir una saturación del 70 % ( $472 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Se centrifugó a  $27.000 \times g$  durante 15 min, y el sedimento obtenido se disolvió en una mínima cantidad de tampón estándar. La suspensión obtenida se dializó frente a 2-5 l del tampón adecuado durante toda la noche, tras lo cual se volvió a centrifugar para eliminar el sedimento conteniendo las proteínas desnaturadas por el tratamiento.

Este método se utilizó generalmente para preparaciones superiores a 50 ml de volumen.

### II.F.12.2. Ultrafiltración

La preparación enzimática se introducía en una célula AMICON equipada con una membrana semipermeable DIAFLO PM-10, y se sometía, con agitación continua a 0-4 °C, a una presión de  $2 \text{ Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ , con  $\text{N}_2$ , hasta quedar en el volumen deseado.

Este método se empleó normalmente para concentrar preparaciones inferiores a 50 ml de volumen, hasta un volumen no inferior a 5 ml.

### II.F.12.3. Evaporación bajo corriente de argón

La preparación se colocó en un tubo fino, en el que se introducía con una aguja una corriente de argón de tal forma que se conseguía agitar suavemente la superficie del líquido. En estas condiciones se mantuvo hasta reducirse al volumen adecuado.



Este método sólo se utilizó para concentrar preparaciones inferiores a 5 ml de volumen.

#### II.F.13. *Diálisis*

Las sales y otras moléculas de pequeño tamaño se eliminaron por diálisis en bolsas de celulosa regenerada VISKING (Serva) de 8, 25 y 45 mm de diámetro, previamente hervidas en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> al 1 % (P/V) y EDTA al 0,01 % (P/V) durante 30 min, y lavadas a continuación con agua destilada.

#### II.F.14. *Medidas del pH*

El pH de las disoluciones se determinó con un pH-metro BECKMAN, modelo  $\phi$  70.

#### II.G. REACTIVOS

El Tris, DTE, p<sub>H</sub>MB, PMSF, TEMED, aminooxiacetato, ácido flaviánico, nitroazul de tetrazolio, azul brillante G de Coomassie, N,N'-dimetil-p-fenilendiamina, ácido metanosulfónico, 3-(2-aminoetil)indol, sulfato de protamina, metil viológeno, flavín y adenín nucleótidos, aminoácidos, y las proteínas alcohol deshidrogenasa, catalasa e inhibidor de tripsina, se obtuvieron de SIGMA.

La ovoalbúmina, seroalbúmina, ferritina, bencil viológeno y azul dextrano, de SERVA.

La acrilamida, bis-acrilamida, SDS, azul de Coomassie R-250, azul de bromofenol, los conjuntos de proteínas patrones utilizados en la electroforesis con SDS, Biogel A-1.5 m (100-200 mesh), Biogel HT (hidroxilapatito), y la resina de intercambio aniónico AG 1-X8 (100-200 mesh, forma acetato), de BIO-RAD

El citocromo *c*, de BOEHRINGER

El Sefadex G-75 y DEAE-Sefacel, de PHARMACIA

Las anfolinas, de LKB

Las sales empleadas en mayor cantidad en los medios de cultivo, como el cloruro amónico y los fosfatos, así como el cloruro sódico, cloruro potásico y sulfato amónico, de PANREAC.

El resto de los productos químicos utilizados, eran de grado analítico y procedían de MERCK.

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA.

Los gases utilizados; anhídrido carbónico, nitrógeno y Argon, eran de alta pureza y fueron adquiridos a la Sociedad Española del Oxígeno (SEO).

### III. RESULTADOS

### III.A. ASIMILACION DE AMONIO POR DIFERENTES ESTIRPES DE *Chlamydomonas reinhardtii*

La Tabla I muestra los datos de la velocidad de incorporación de amonio encontrados para diferentes estirpes de *C. reinhardtii*, obtenidos midiendo la desaparición del amonio del medio de cultivo, tanto en la luz como en la oscuridad. Se observan velocidades comprendidas entre 10 y 20  $\mu\text{moles}$  de amonio consumido por h y mg de clorofila, en condiciones de iluminación.

En todas las estirpes estudiadas, las velocidades de consumo de amonio disminuyen muy significativamente por la presencia de MSX 1 mM, o al colocar los cultivos en la oscuridad. No obstante, es importante indicar que el mutante 203, que muestra la velocidad de consumo de amonio más alta ( $22,6 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{chl}$ ), puede asimilar amonio a una velocidad muy significativa ( $13,9 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{chl}$ ), incluso en presencia de MSX.

Por otra parte, cuando las células de *C. reinhardtii* se someten previamente a un periodo de 24 h de carencia de nitrógeno, y se estudia posteriormente su velocidad de consumo de amonio, se observa que ésta es extraordinariamente alta ( $53,6 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{chl}$ ), del orden de 5 veces superior a la observada en células normales no sometidas a carencia nutricional.

### III.B. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA EN CELULAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* PERMEABILIZADAS CON TOLUENO Y EN EXTRACTOS CRUDOS DEL ALGA

La actividad GOGAT puede detectarse fácilmente *in situ*, permeabilizando las células con tolueno, lo que permite

TABLA I

VELOCIDADES DE INCORPORACION DE AMONIO  
EN DIFERENTES ESTIRPES DE *C. reinhardtii*

Estirpe	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido ( $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ chl}$ )		
	Luz	Luz + MSX	Oscuridad
6145 c	14,3	1,4	1,2
21 gr	12,8	1,6	1,6
102	19,0	1,6	0,2
104	9,4	1,5	0,5
203	22,6	13,9	0,2
301	11,9	1,8	3,7
305	10,9	1,9	1,2
307	10,5	1,9	4,1
21 gr (hambrientas de nitrógeno)	53,6	-	-

Células crecidas con amonio, se recogieron, se lavaron y resuspendieron en nuevo medio de cultivo, hasta una concentración final de chl de 20-30  $\mu\text{g}$  por ml. En cada caso, 50 ml de la suspensión celular se colocaron en erlenmeyer diferentes de 250 ml de capacidad, a 25 °C, y en presencia de NaHCO<sub>3</sub> 7 mM, y, donde se indica, se trataron con MSX 1 mM. Después de 10 min bajo iluminación, o hasta que la actividad GS quedaba totalmente inhibida cuando había MSX (unos 30 min), se adicionó a cada cultivo NH<sub>4</sub>Cl 0,25 mM, determinándose el amonio, según se indica en Materiales y Métodos, desde entonces (tiempo 0) y a intervalos de 10 min. Para los experimentos en oscuridad, los cultivos se envolvieron en papel de aluminio.

te el libre paso a través de la membrana de los sustratos y productos de la reacción enzimática, pudiendo valorarse la actividad a expensas del glutamato formado (apartado II.C.4).

Como puede apreciarse en la Tabla II, la actividad ensayada requiere para su funcionamiento glutamina, 2-oxo glutarato y una fuente de poder reductor que puede ser la ferredoxina o el metil viológeno químicamente reducidos con ditionito, o el NADH. Dicha actividad es eficazmente inhibida por azaserina. Por otra parte, la presencia de aminooxiacetato, conocido inhibidor de transaminasas, permite asegurar que el glutamato formado se debe a la transferencia del grupo amida de la glutamina y no a la acción de otras transaminasas presentes en las células.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de medida *in situ* de la actividad glutamato sintasa, procedimos a hacer un estudio del nivel intracelular de dicha actividad en las distintas estirpes de *Chlamydomonas*. La Fig. 5 muestra que la estirpe silvestre 21 gr presenta un nivel de actividad considerablemente superior a las demás, por lo que dicha estirpe fue utilizada para ulteriores estudios, incluyendo los de purificación enzimática. Los índices medios de actividad Fd- y NADH- GOGAT de células de la estirpe 21 gr, en condiciones normales de cultivo, se detallan en la Tabla III.

La Fig. 6 muestra, por su parte, los niveles de actividad glutamato sintasa, ensayada con ferredoxina reducida o NADH, en extractos obtenidos al romper células de la mencionada estirpe 21 gr por congelación-descongelación con nitrógeno líquido, sonicación o vibración con perlas de vidrio. La congelación en nitrógeno líquido es el método de rotura que permite recuperar un mayor nivel de actividad Fd-GOGAT en el extracto crudo, por lo que se utilizó en orden a su posterior purificación. Por otra parte,

TABLA II

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO  
SINTASA EN CELULAS PERMEABILIZADAS DE *C.*  
*reinhardii*

Sistema	Actividad ( mU·mg <sup>-1</sup> chl )
MVH-GOGAT	300
- glutamina	0
- 2-oxoglutarato	35
- aminooxiacetato	321
- metil viológeno	60
- ditionito	33
- células	0
+ azaserina	0
Fd-GOGAT	246
NADH-GOGAT	45
NADPH-GOGAT	7

Se tomaron alícuotas de 10 ml de un cultivo conteniendo 40 µg chl por ml, y se determinó la actividad GOGAT *in situ* tras permeabilizar las células con tolueno, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA III

ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA EN CELULAS  
DE *C.reinhardtii* PERMEABILIZADAS CON TO  
LUENO

Actividad	mU·mg <sup>-1</sup> de		
	<i>células</i>	<i>clorofila</i>	<i>proteína</i>
NADH-GOGAT	0,25	35	10
Fd-GOGAT	1,82	250	75

Las actividades se midieron, en todos los casos, en las células de la estirpe *21 gr* contenidas en 10 ml de cultivo, recogidas, lavadas y permeabilizadas según se indica en Materiales y Métodos.



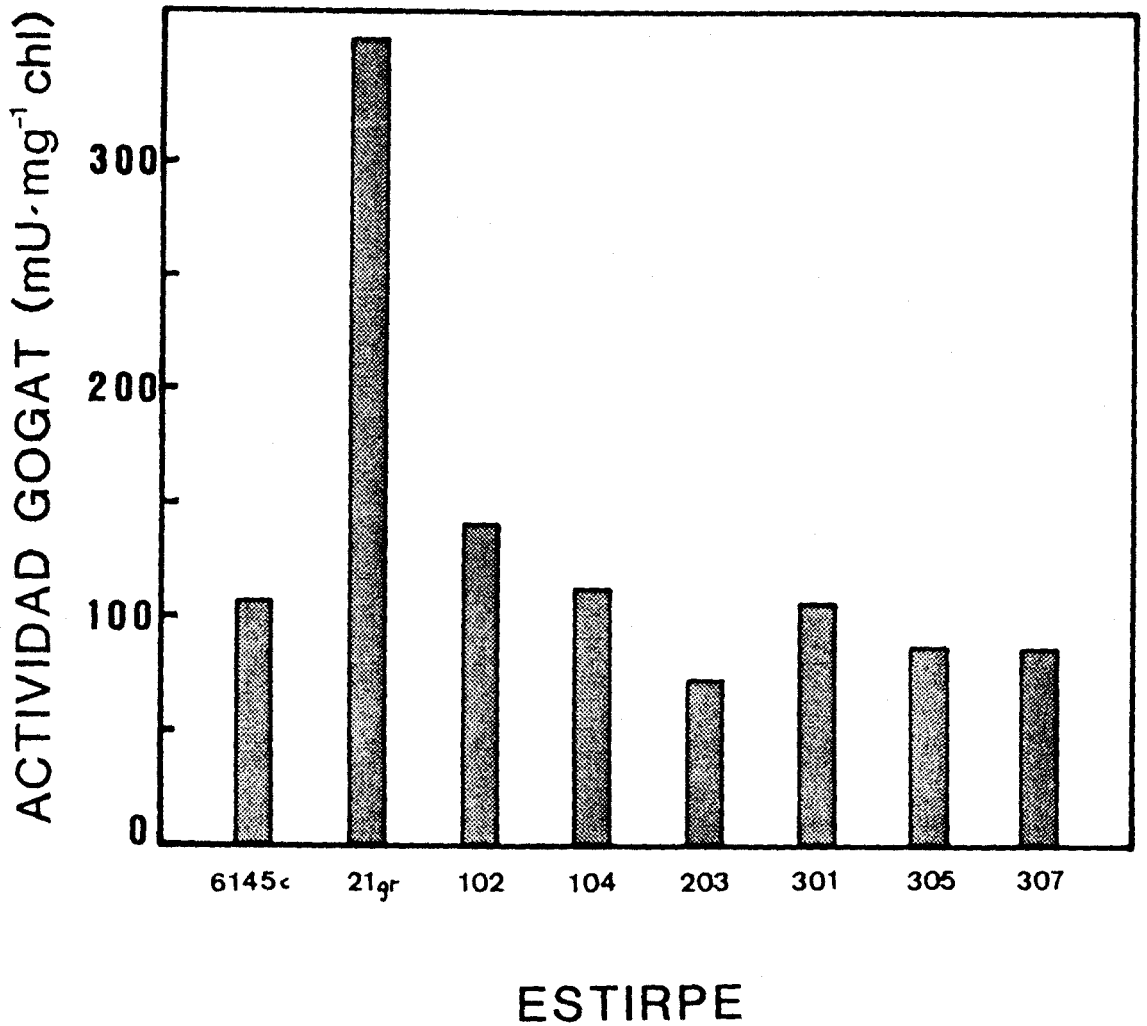


Figura 5. Actividad glutamato sintasa en diferentes estirpes de *C.reinhardtii*.

La actividad MVH-GOGAT se determinó, en cada caso, para 10 ml del cultivo, conteniendo 20 a 40  $\mu\text{g}$  de chl por ml, cuyas células se recogieron, lavaron y permeabilizaron con tolueno en los términos indicados en Materiales y Métodos.

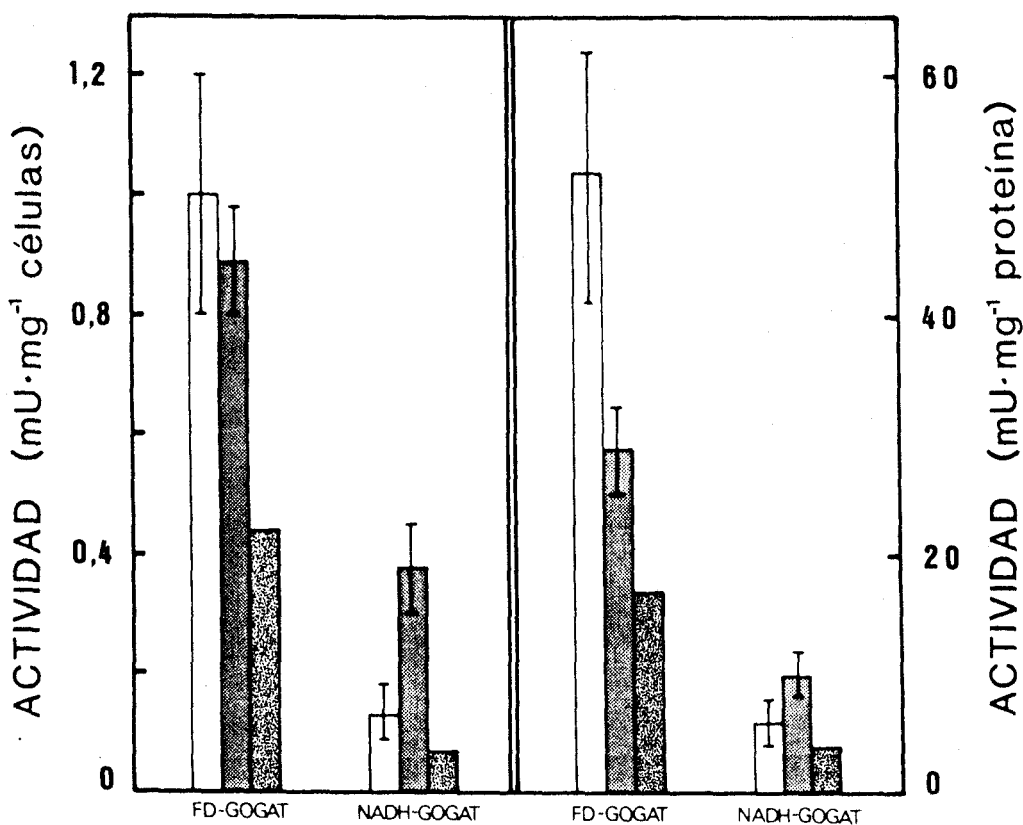


Figura 6. Actividad glutamato sintasa en extractos de *C. reinhardtii* obtenidos por diferentes métodos de rotura.

Las distintas barras representan los valores medios obtenidos para las actividades Fd-GOGAT y NADH-GOGAT en extractos crudos de la estirpe 21 gr, obtenidos al romper las células por congelación-descongelación con nitrógeno líquido (□), sonicación (▨) o vibración con perlas de vidrio (■). Los procedimientos utilizados se describen en Materiales y Métodos.

la sonicación permite recuperar el mayor nivel de actividad NADH-GOGAT, por lo que dicho método fue el utilizado en la purificación de esta enzima, si bien es importante señalar que los extractos que se obtenían en este caso contenían una mayor cantidad de proteínas y pigmentos.

La Tabla IV recoge una caracterización exhaustiva de la actividad glutamato sintasa, analizada en extractos de la estirpe 21 gr de *Chlamydomonas*, con diferentes sistemas donadores de electrones. En todos los casos la actividad es absolutamente dependiente de glutamina, 2-oxoglu tarato y un reductor, y se manifiesta significativamente cuando se utiliza metil viológeno o ferredoxina, reducidos químicamente con ditionito, o bien NADH, como sistema donador de electrones. El NADPH es mucho menos eficaz que el NADH. Asimismo, el ditionito *per se* es un pobre donador de electrones para la enzima. Bencil viológeno y flavinas reducidos con ditionito, son fuentes ineficaces de poder reductor.

La Tabla V muestra que la actividad GOGAT de extractos crudos, ensayada tanto con NADH, MVH o ferredoxina reducida, resulta fuertemente inhibida por la presencia de análogos de glutamina como la azaserina y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON). La actividad NADH-GOGAT parece ser la menos sensible a la acción de estos inhibidores. El *p* HMB, agente bloqueante de grupos sulfhidrilos, también resulta un fuerte inhibidor de la actividad GOGAT, indicando la participación de grupos tiólicos en la catálisis enzimática. La albizziina (otro análogo de glutamina), y cianuro y cianato (quelantes metálicos), no inhiben significativamente la actividad glutamato sintasa en extractos crudos.

Por otra parte, la actividad glutamato sintasa presenta, en extractos crudos, una vida media de 30 h aproximadamente, cuando se mantienen a 4 °C. Se intentó mejorar este índice por la adición, conjunta o separada, de conoci-

TABLA IV

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO  
SINTASA EN EXTRACTOS DE *C. reinhardtii*

Sistema	Actividad (mU · mg <sup>-1</sup> proteína)
NADH-GOGAT	12,8
- glutamina	0,0
- 2-oxoglutarato	0,8
- aminooxiacetato	13,1
- NADH	0,7
- extracto	0,0
NADPH-GOGAT	3,9
MVH-GOGAT	33,6
- glutamina	0,0
- 2-oxoglutarato	1,6
- aminooxiacetato	35,3
- metil viológeno	6,7
- ditionito	0,9
- extracto	0,0
Fd-GOGAT	25,0
BVH-GOGAT	3,5
FADH <sub>2</sub> -GOGAT	5,9
FMNH <sub>2</sub> -GOGAT	5,0

Los distintos sistemas incluían, en un volumen final de 2 ml, 200 µmol de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 10 µmol de L-glutamina; 10 µmol de 2-oxoglutarato sódico; 10 µmol de aminooxiacetato; 3 µmol de NAD(P)H, 20 µmol de viológenos, 24 µmol de ferredoxina y 2 µmol de flavinas. Después de 20 min a 30 °C, se determinó el glutamato formado, por el procedimiento que se menciona en Materiales y Métodos.

TABLA V

INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO  
SINTASA EN EXTRACTOS CRUDOS DE *C.reinhardtii*

Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad GOGAT (%)		
		<i>NADH</i> -	<i>Fd</i> -	<i>MVH</i> -
Ninguno	-	100	100	100
Azaserina	5	25	7	0
DON	5	24	5	29
Albizziina	5	59	137	88
Cianuro	1	71	91	72
Cianato	1	80	85	70
<i>p</i> HMB	0,5	27	33	0

La actividad glutamato sintasa se determinó, en cada caso, según se describe en Materiales y Métodos, con un extracto crudo obtenido por sonicación, incluyendo los inhibidores mencionados, a las concentraciones finales que se indican. Cuando se estudiaba el efecto del *p*HMB se omitía el DTE en el tampón de extracción.

dos agentes protectores, como glicerol al 10 % (V/V); PMSF, 1 mM; 2-oxoglutarato, 2 mM; glutamina, 2 mM; NaCl 100 mM; FAD 10  $\mu$ M, FMN 10  $\mu$ M, sin obtener resultados positivos. La congelación del extracto y/o su mantenimiento en condiciones anaeróbicas, tampoco resultó ser eficaz. Solamente se observó protección significativa de la actividad glutamato sintasa cuando se añadió al extracto crudo DTE 0,2 mM, protector de grupos sulfhidrilos, y EDTA, 0,5 mM, conocido quelante de metales.

### III.C. NIVELES DE LAS ACTIVIDADES GLUTAMATO SINTASA EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

Se estudiaron los niveles de actividad GOGAT en células de *Chlamydomonas*, cultivadas con  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de nitrógeno, y variando las siguientes condiciones:

- a) Cultivo bajo iluminación y burbujeado con aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  (5 %, V/V).
- b) Cultivo bajo iluminación y burbujeado con aire solamente,  $|\text{CO}_2| = 0,03$  % (V/V).
- c) Cultivo en oscuridad y con acetato 24 mM, como fuente de carbono.

La Fig. 7 muestra los resultados obtenidos al respecto, no apreciándose grandes variaciones en el nivel de actividad Fd-GOGAT, que es superior en las condiciones de óptima actividad fotosintética, es decir, bajo iluminación y abundancia de  $\text{CO}_2$ . La actividad NADH-GOGAT presenta oscilaciones más significativas, según las diferentes condiciones de cultivo utilizadas, siendo su nivel intracelular significativamente superior en las células cultivadas en oscuridad con acetato, mientras que el nivel más bajo

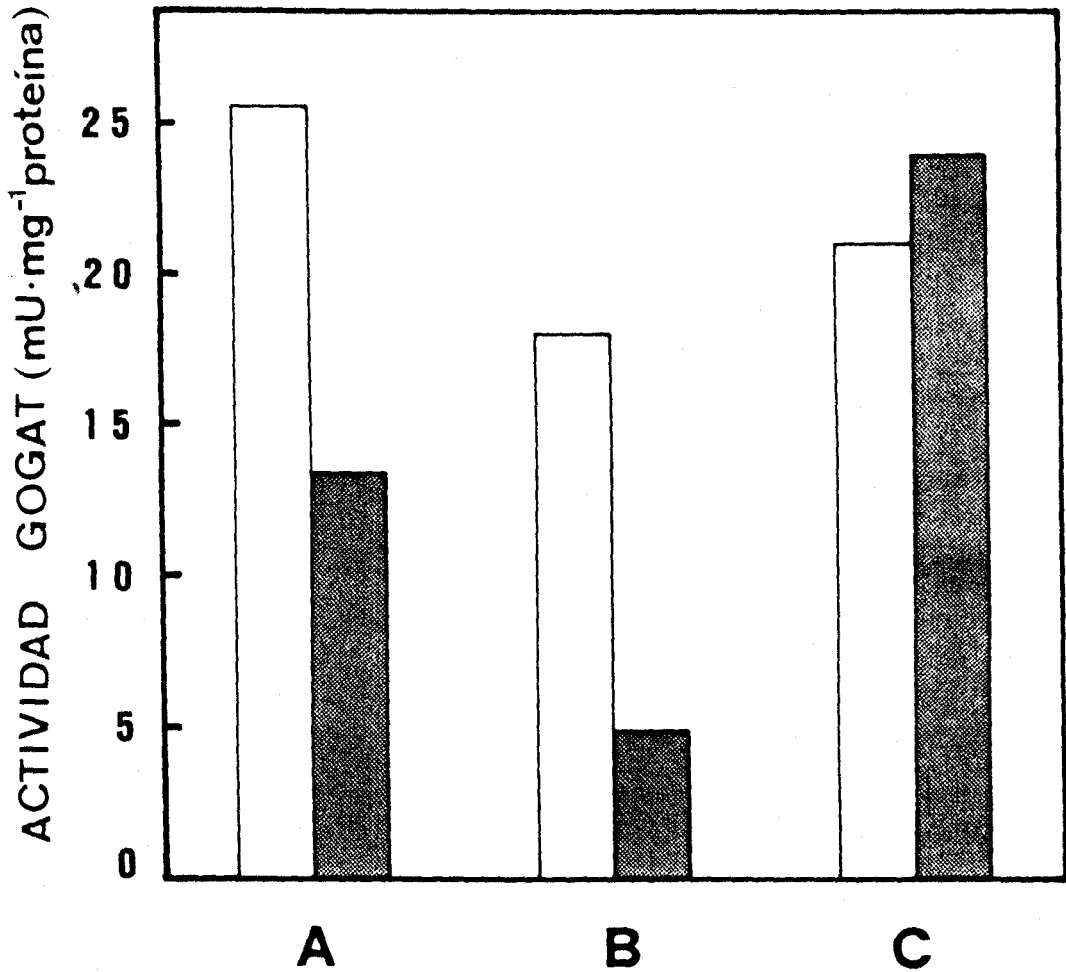


Figura 7. Niveles de actividad glutamato sintasa en células de *C.reinhardtii* crecidas en la luz y en la oscuridad.

Tres cultivos se mantuvieron durante 24 h creciendo en el medio estándar, y en la presencia de luz con aire enriquecido en CO<sub>2</sub> (A), en luz con aire sólo (B), o en oscuridad en presencia de acetato sódico (C). Se recogieron las células por centrifugación, y se determinaron las actividades específicas de Fd-GOGAT (□) y NADH-GOGAT (■) para extractos de las mismas obtenidos por sonicación. Para más detalles, ver Materiales y Métodos.

de esta enzima se presenta en las células cultivadas con aire solamente, condiciones en las que el  $\text{CO}_2$  es claramente limitante.

La Tabla VI muestra el efecto de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, sobre el nivel intracelular de la actividad GOGAT ensayada con MVH como donador de electrones. La actividad es máxima en células hambrientas de nitrógeno, y, respecto a la fuente nitrogenada, parece ser que el nivel enzimático más elevado se consigue en presencia de amonio, no apreciándose diferencias importantes entre nitrato o nitrito.

La Fig. 8 muestra un estudio de la variación del nivel intracelular de la actividad GOGAT con el tiempo, en células en un medio sin fuente de nitrógeno. El nivel de NADH-GOGAT aumenta considerablemente al cabo de 24 h, experimentando la actividad específica, referida a chl, un incremento de 12 veces, mientras que la actividad referida a mg de proteína aumenta sólo 5 veces. Por su parte, la Fd-GOGAT experimenta sólo un ligero incremento, del orden de 2 veces, como puede verse en la parte inferior de la Fig. 8. A partir de las 24 h, el cultivo degenera, indicando que se alcanza el periodo máximo soportable de hambre de nitrógeno, por lo cual el dato recogido a las 32 h de iniciado el experimento (Fig. 8, línea de trazos), no es representativo.

Por otra parte, la adición de amonio a las células hambrientas de nitrógeno, produce un aumento significativo de la actividad GOGAT, tanto si se ensaya con NADH, como si se hace con ferredoxina reducida, como donador de electrones. El aumento de actividad tiene lugar en un corto intervalo de tiempo, alcanzándose en cada caso un valor máximo después de 7 h de la adición de amonio. Posteriormente, las actividades decrecen paulatinamente hasta recuperar un nivel intracelular normal (Fig. 9), a la



TABLA VI

EFFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO EN  
EL NIVEL DE ACTIVIDAD GLUTAMATO SIN  
TASA DE *C. reinhardii*

Fuente de nitrógeno	Actividad GOGAT (mU · mg <sup>-1</sup> chl)
Ninguna	462
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	350
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	227
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	236

Células cultivadas en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de nitrógeno, se recogieron y lavaron dos veces con medio de cultivo sin fuente de nitrógeno, resuspendiéndose posteriormente en dicho medio hasta 30-40 µg de chl por ml. Esta suspensión celular se distribuyó en 4 cultivos, a los que se adicionó la fuente de nitrógeno que se indica, a una concentración 3 mM, determinándose *in situ* el nivel intracelular de MVH-GOGAT después de 22 h de crecimiento.

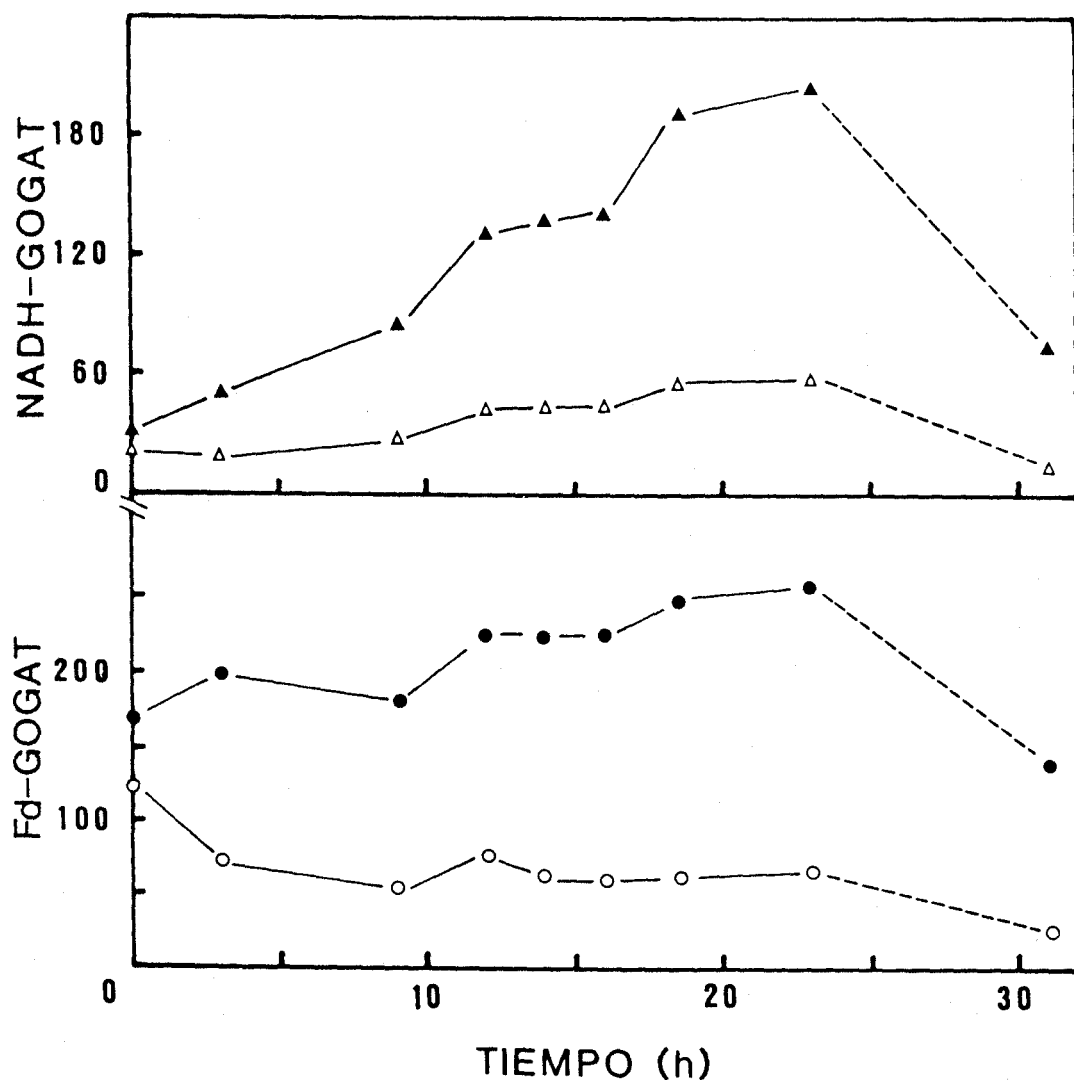


Figura 8. Niveles de actividad glutamato sintasa en células de *C.reinhardtii* cultivadas en un medio carente de nitrógeno.

Células que habían sido crecidas a la luz con amonio como fuente de nitrógeno, se recogieron y lavaron 2 veces con medio de cultivo sin fuente nitrogenada, en el que se resuspendieron hasta una concentración final de chl de 20  $\mu\text{g}$  por ml. A distintos tiempos se determinaron *in situ*, tal y como se describe en Materiales y Métodos, las actividades Fd-GOGAT y NADH-GOGAT. Se representan las actividades específicas en mU por mg de chl (símbolos negros) y mU por mg de proteína (símbolos blancos).

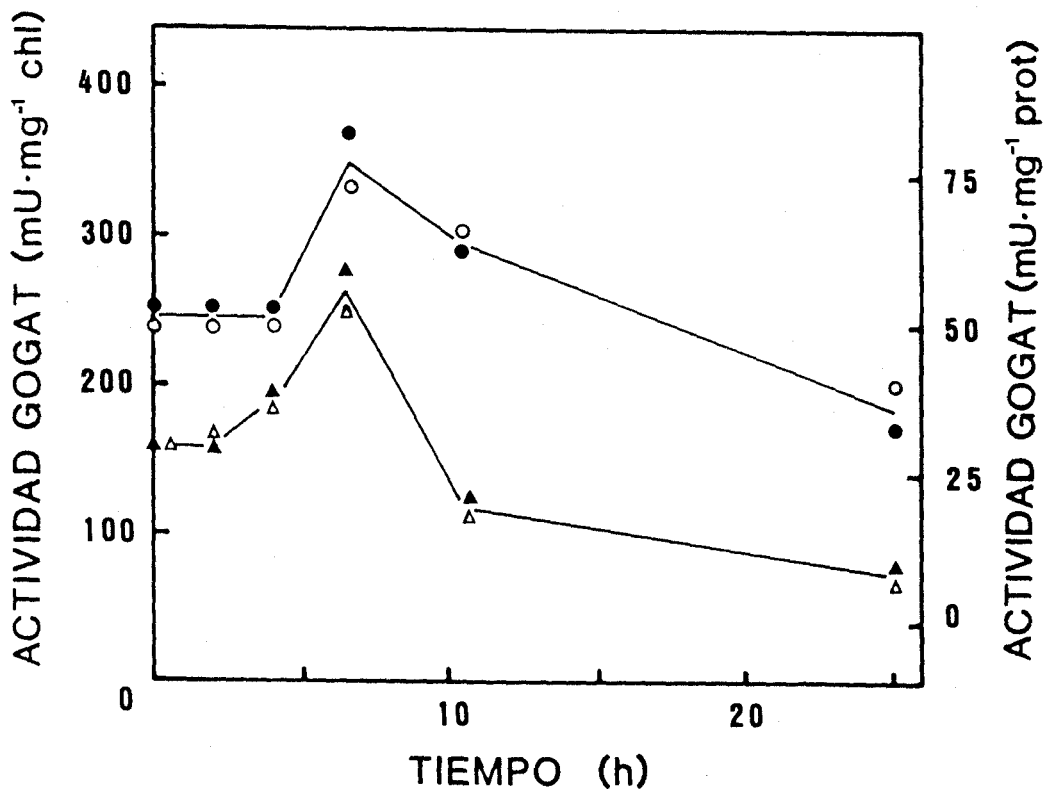


Figura 9. Efecto de la adición de amonio a células de *C. reinhardtii* hambrientas de nitrógeno, sobre la actividad glutamato sintasa.

A células que habían sido cultivadas durante 22 h en un medio carente de nitrógeno, se les adicionó cloruro amónico 5 mM (tiempo 0), y, a los tiempos indicados, se determinaron *in situ* las actividades Fd-GOGAT (círculos) y NADH-GOGAT (triángulos) en alícuotas del cultivo. Los símbolos negros indican actividad en mU por mg de chl, y los blancos, en mU por mg de proteína. Para más detalles experimentales, ver Materiales y Métodos.

par que el organismo alcanza una velocidad de crecimiento adecuada (no mostrado). En este caso se observa un paralelismo total entre las actividades específicas relativas a mg de clorofila y de proteína, respectivamente.

#### III.D. SEPARACION POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA, A PARTIR DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Chlamydomonas reinhardtii*.

Cuando se aplica un extracto crudo, que ha sido previamente tratado con sulfato de protamina (apartado II.E), a una columna (2,8 x 23 cm) de intercambio iónico, empaquetada con DEAE-Sefacel, y equilibrada con tampón estándar, la actividad GOGAT queda retenida en el lecho.

Si se eluyen las proteínas adsorbidas mediante un gradiente lineal de cloruro sódico (0-0,3 M), se pueden separar las actividades Fd-GOGAT y NADH-GOGAT (Fig. 10, B), indicando que dichas actividades van asociadas a proteínas diferentes. Las dos enzimas, además, conllevan también asociada una actividad MVH-GOGAT (Fig. 10, C). Al mismo tiempo, esta cromatografía supone también una buena etapa de purificación de ambas proteínas, separándolas de aquéllas que no son retenidas en la columna, y de las que eluyen a una fuerza iónica superior. La Fig. 10, A, muestra el perfil de elución de la proteína durante este tratamiento.

Por otra parte, esta cromatografía de intercambio iónico tiene también un interés adicional, pues con ella se consigue separar, a modo de subproducto, la ferredoxina de *Chlamydomonas*, proteína sustrato de la Fd-GOGAT, que también ha sido purificada y caracterizada en este trabajo (apartado III.F), a la vez que ampliamente utilizada para los ensayos de actividad Fd-GOGAT y la elaboración de la

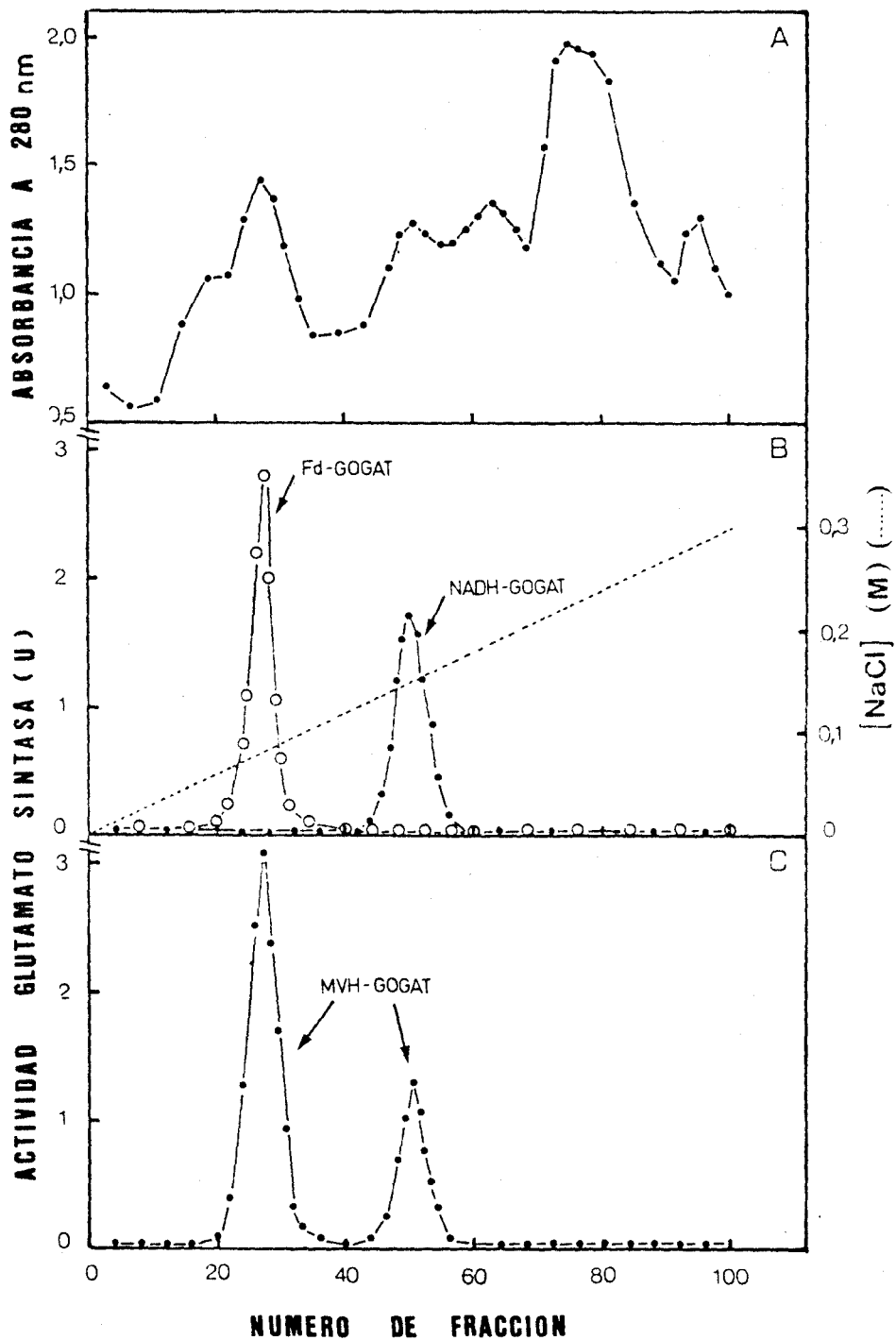


Figura 10. Perfil de elución de la actividad glutamato sintasa de *C. reinhardtii*, adsorbida en una columna de DEAE-Sefacel.

Se aplicó a la columna (2,8 x 23 cm) el extracto obtenido a partir de 53 g de células (peso húmedo), previamente tratado con sulfato de protamina. La columna se lavó con tampón estándar y las proteínas adsorbidas se eluyeron con 500 ml de un gradiente lineal de NaCl, 0-0,3 M. En A, se muestra la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas. En B, las actividades glutamato sintasa dependientes de NADH y ferredoxina, ensayadas en alícuotas de cada fracción. C representa la actividad MVH-GOGAT de las distintas fracciones.

columna de afinidad de Fd-Sefarosa.

### III.E. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE *Chlamydomonas reinhardtii*

#### III.E.1. Comentarios sobre el método de purificación

La purificación de la NADH-GOGAT se llevó a cabo a partir de extractos crudos obtenidos por sonicación, por el procedimiento detallado en Materiales y Métodos (apartado II.E.1), que incluía, de forma resumida, los siguientes pasos de purificación:

##### a) Tratamiento con sulfato de protamina

Este paso tenía como objetivo fundamental eliminar del extracto crudo la mayor parte de su contenido de pigmentos y ácidos nucleicos, que son abundantes y que presentan importantes interferencias durante la purificación. Se probaron diferentes concentraciones de sulfato de protamina a partir de una disolución al 2 % (P/V), de la que se adicionaron diferentes cantidades al extracto. La proporción óptima resultó ser del 10 % (V/V) en la mezcla final, es decir, 1 ml de sulfato de protamina por cada 10 ml de extracto. Con este tratamiento se conseguía, además, una purificación de 2 a 3 veces de la NADH-GOGAT, siendo la recuperación de actividad prácticamente total (90-100 %).

##### b) Cromatografía en DEAE-Sefacel

Las incidencias relativas a este paso se han comentado ya en el apartado III.D.

##### c) Cromatografía en Cibacrón-Sefarosa

Las fracciones con actividad NADH-GOGAT obtenidas en la cromatografía anterior, se juntaron, y la prepa

ración enzimática resultante se concentró por precipitación con sulfato amónico, tal y como se indica en Materiales y Métodos (apartado II.F.12.1 ). La enzima concentrada se aplicó a una columna de Cibacrón-Sefarosa, y se eluyó con un gradiente de fosfato, tal y como puede apreciarse en la Fig. 11.

Aunque la adsorción de la NADH-GOGAT a la Cibacrón-Sefarosa no era muy fuerte, esta cromatografía permitía separarla con facilidad de las proteínas inespecíficas por el Cibacrón, que no resultaron adsorbidas en la columna, así como de aquéllas que mostraban alta afinidad por el ligando, las cuales se desplazaban de la columna con una fuerza iónica superior (KCl, 3M).

En la Fig. 11 puede apreciarse también cómo, conjuntamente con la actividad NADH-GOGAT, se eluye de la columna de afinidad una actividad NADH-ferricianuro reductasa, lo que indica que ambas actividades se encuentran probablemente asociadas en el mismo complejo enzimático.

#### d) Cromatografía en Biogel

La solución enzimática obtenida en el paso anterior se concentró por ultrafiltración (apartado II.F.12.2 ), y se filtró a través de una columna de Biogel A-1.5 m, obteniéndose el perfil de elución representado en la Fig. 12. En esta Figura se muestra también cómo tras la filtración en gel coeluyen la actividad NADH-ferricianuro reductasa y la NADH-GOGAT, lo que corrobora, esta vez por un criterio de separación distinto, lo expuesto en el apartado anterior.

El procedimiento de purificación conseguido, se recoge de forma conjunta en la Tabla VII, y permite obtener una preparación enzimática con una actividad específica de  $4,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , una recuperación del 15 % y un factor de purificación de 351

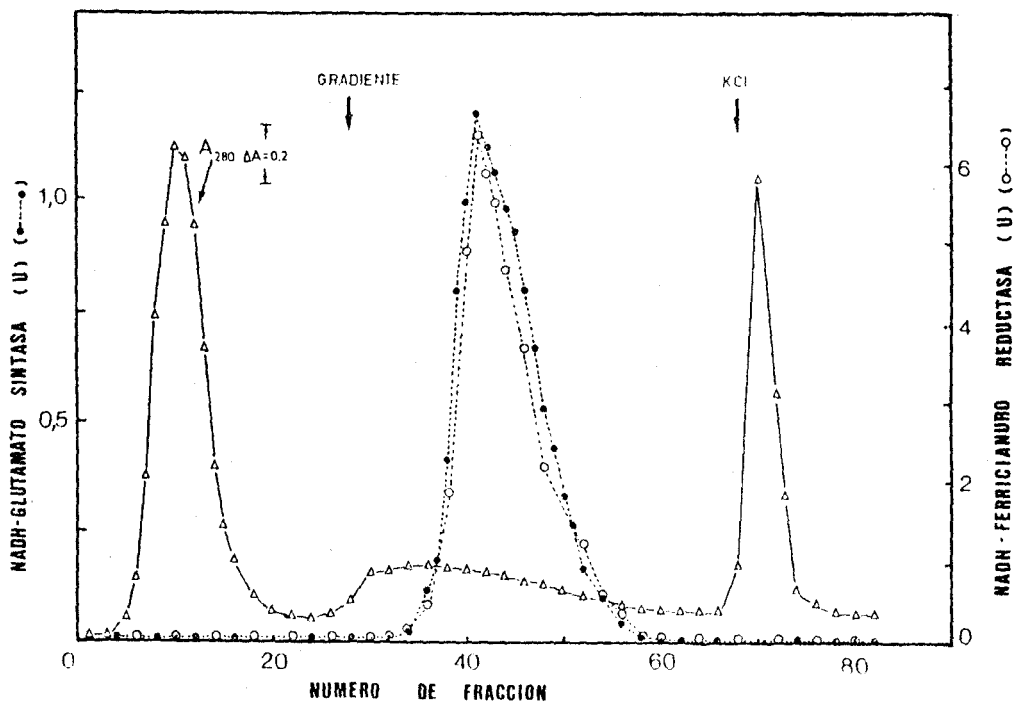


Figura 11. *Cromatografía de afinidad en Cibacrón-Sefarosa de la NADH-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

La enzima se pasó a través de una columna de Cibacrón-Sefarosa, que se lavó a continuación con tampón estándar. Las flechas indican los sucesivos puntos de aplicación del gradiente de fosfato y de KCl 3 M, tal y como se menciona en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, determinándose las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa para alícuotas de cada fracción, así como la absorbancia a 280 nm.



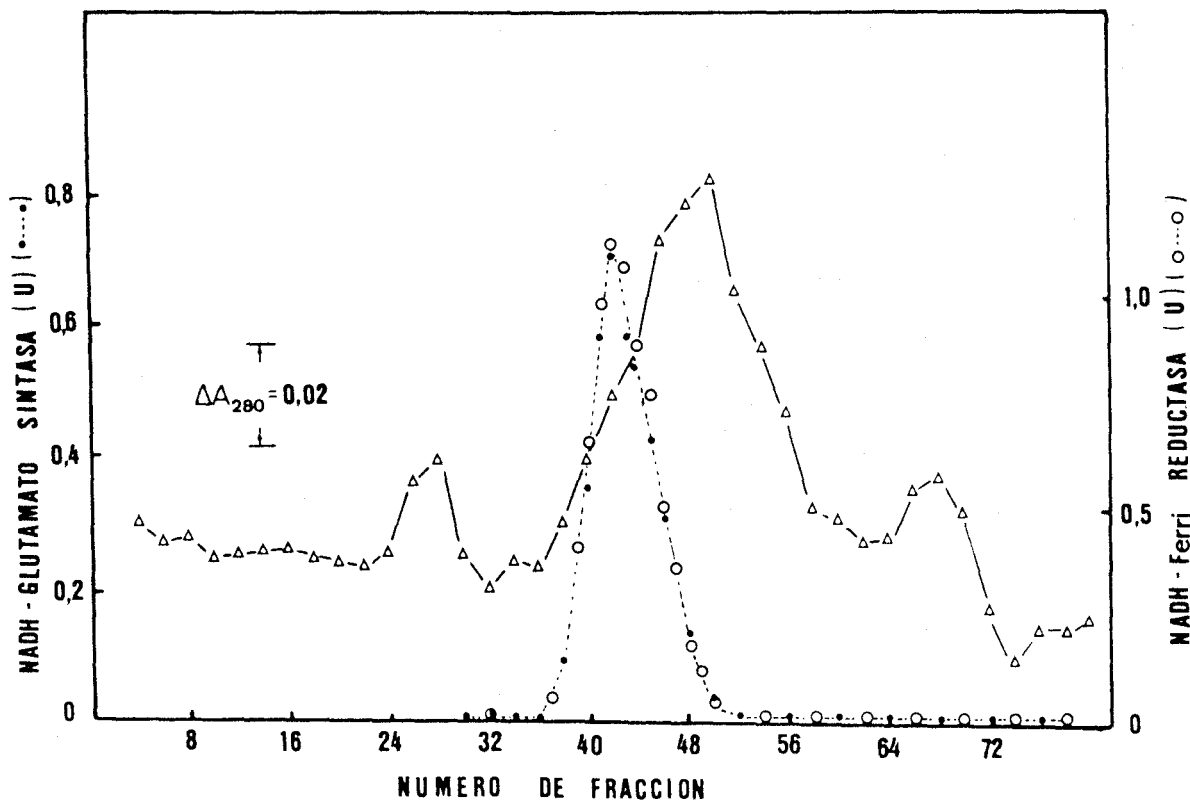


Figura 12. Elución de la NADH-glutamato sintasa de *C.reinhardtii* a través de una columna de Biogel A-1.5m.

Se aplicaron 5,9 U de actividad enzimática a la columna, previamente equilibrada en tampón estándar. A cada una de las fracciones recogidas, de 1,9 ml, se les determinó la absorbancia a 280 nm ( $\Delta$ — $\Delta$ ) así como las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa.

TABLA VII  
PURIFICACION DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardii*

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Recuperación (%)	Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> )
Extracto crudo	217	1.584	20,6	100	0,013
1.Sobrenadante de protamina	220	717	22,4	109	0,031
2.Eluato de DEAE-Sefacel	51	43	13,2	64	0,307
3.Eluato de Cibacrón-Sefarosa	22	3,5	5,5	26	1,550
4.Eluato de Biogel	13	0,7	3,2	15	4,565

La purificación que se recoge se realizó a partir de 53 g de células (peso húmedo), por el procedimiento que se detalla en el texto. La actividad se midió colorimétricamente tal y como se describe en Materiales y Métodos.

veces.

La preparación de NADH-GOGAT así purificada no resultó ser electroforéticamente homogénea, ya que el gel de electroforesis presentaba 2 ó 3 bandas de proteína, de las que una sola mostraba actividad diaforasa.

### III.E.2. *Estudios catalíticos y cinéticos*

#### III.E.2.1. Actividades del complejo enzimático NADH-GOGAT

De los resultados expuestos anteriormente podía deducirse que la NADH-GOGAT de *Chlamydomonas* era un complejo enzimático que podía ensayarse, además de por su actividad fisiológica (NADH-glutamato sintasa), por otras dos actividades asociadas. Por un lado, una actividad capaz de reducir un aceptor artificial de electrones, como el ferri cianuro, con NADH (actividad NADH-diaforasa o actividad NADH-ferricianuro reductasa), y, por otro, una actividad capaz de catalizar la síntesis de glutamato a expensas de metil viológeno reducido químicamente con ditionito como donador de electrones (actividad MVH-GOGAT).

#### III.E.2.2. Especificidad por sustratos

La preparación purificada de NADH-GOGAT presentaba una alta especificidad por glutamina y 2-oxoglutarato como donador y aceptor, respectivamente, del grupo  $-NH_2$ . Así, la enzima era inactiva con asparraguina, amonio o hidroxil amina como donadores de nitrógeno para la reacción, y con oxaloacetato o piruvato como esqueletos carbonados aceptores.

La enzima parcialmente purificada mostró un requerimiento específico por el NADH para la actividad NADH-GOGAT, siendo inactiva con NADPH.

Con respecto a la actividad NADH-diaforasa, la Tabla VIII pone de manifiesto que el ferricianuro es el mejor aceptor artificial de los electrones, y que el NADPH es mucho menos efectivo que el NADH como donador de electrones.

Por su parte, en la actividad MVH-GOGAT, el metil viológico no podía sustituirse por bencil viológico, FAD ó FMN como donadores de electrones.

### III.E.2.3. Valores de $K_m$ para los diferentes sustratos

Se realizaron una serie de representaciones de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reacción, medidas espectrofotométricamente, frente a concentraciones variables de los distintos sustratos, con el objetivo de estudiar la afinidad del complejo enzimático NADH-GOGAT por cada uno de ellos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IX.

Es interesante señalar que la afinidad de la enzima por los sustratos fisiológicos (glutamina, 2-oxoglutarato y NADH) es mucho mayor que por los sustratos artificiales (ferricianuro y metil viológico).

En la Fig. 13 se recogen las representaciones de dobles recíprocos para los sustratos de la actividad fisiológica de la enzima. La curvatura de la recta en la proximidad del eje de ordenadas es indicativa de una posible inhibición por los sustratos NADH y 2-oxoglutarato, corroborando lo que se pone de manifiesto en el apartado III.E.2.7.

### III.E.2.4. pH óptimo

La Fig. 14 pone de manifiesto la dependencia de la actividad NADH-GOGAT de *Chlamydomonas* respecto al pH, en un intervalo comprendido entre 3,5 y 10,5. Esta actividad pre

TABLA VIII

ACEPTORES DE ELECTRONES PARA LA ACTIVIDAD  
DIAFORASA DEL COMPLEJO NADH-GLUTAMATO SIN  
TASA DE *C. reinhardii*

Aceptor de electrones	Actividad diaforasa ( mU )	
	<i>NADH</i>	<i>NADPH</i>
Ninguno	0	0
Ferricianuro	476	56
Citocromo <i>c</i>	2	1
2,6 diclorofenol indofenol (DPIP)	0	0
FAD	0	0
FMN	0	0

Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos para el ensayo estándar de la actividad NADH-ferricianuro reductasa, utilizando las siguientes cantidades de los distintos aceptores, en lugar de ferricianuro: citocromo *c*, 80 nmol; flavinas, 1  $\mu$ mol; DPIP, 1  $\mu$ mol. Cuando se utilizó NADPH como donador de electrones, iba a la misma concentración que el NADH en el ensayo estándar. En cada determinación de actividad se utilizaron 5,3  $\mu$ g de proteína de una preparación purificada.

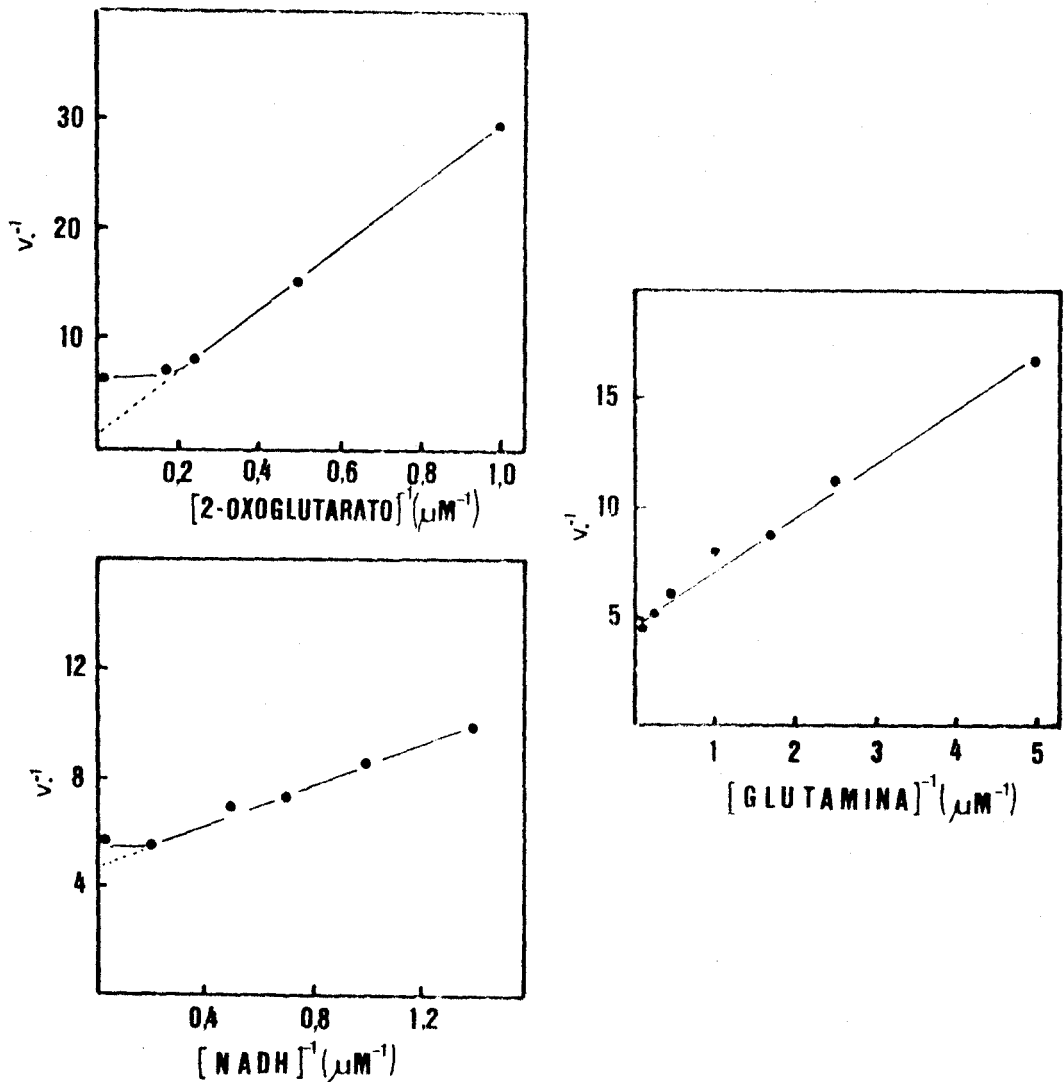


Figura 13. Representaciones de dobles recíprocos para diferentes concentraciones de 2-oxoglutarato, glutamina y NADH, de la actividad NADH-glutamato sintasa de *C.reinhardtii*.

La actividad NADH-GOGAT se midió espectrofotométricamente según se describe en Materiales y Métodos, con cantidades variables y no saturantes de los sustratos que se indican en cada caso. Los valores de  $K_m$  obtenidos merced a estas representaciones, se muestran conjuntamente en la Tabla IX.

TABLA IX

VALORES DE  $K_m$  PARA LOS SUSTRATOS DEL  
 COMPLEJO NADH-GLUTAMATO SINTASA DE *C.*  
*reinhardii*

Actividad ensayada	Sustrato	$K_m$ ( $\mu M$ )
NADH-glutamato sintasa	NADH	8
NADH-glutamato sintasa	glutamina	600
NADH-glutamato sintasa	2-oxoglutarato	18
MVH-glutamato sintasa	MVH	1.500
NADH-ferricianuro reductasa	NADH	33
NADH-ferricianuro reductasa	Ferricianuro	400

Las actividades enzimáticas se ensayaron espectrofotométricamente según se indica en Materiales y Métodos, excepto que el sustrato cuya  $K_m$  se trataba de medir, se añadía a distintas concentraciones no saturantes. Los datos de velocidad inicial de la reacción que se obtuvieron, se representaron en función de la concentración de sustrato utilizada en cada caso mediante la representación de Lineweaver-Burk, determinándose así gráficamente el valor de  $K_m$ .

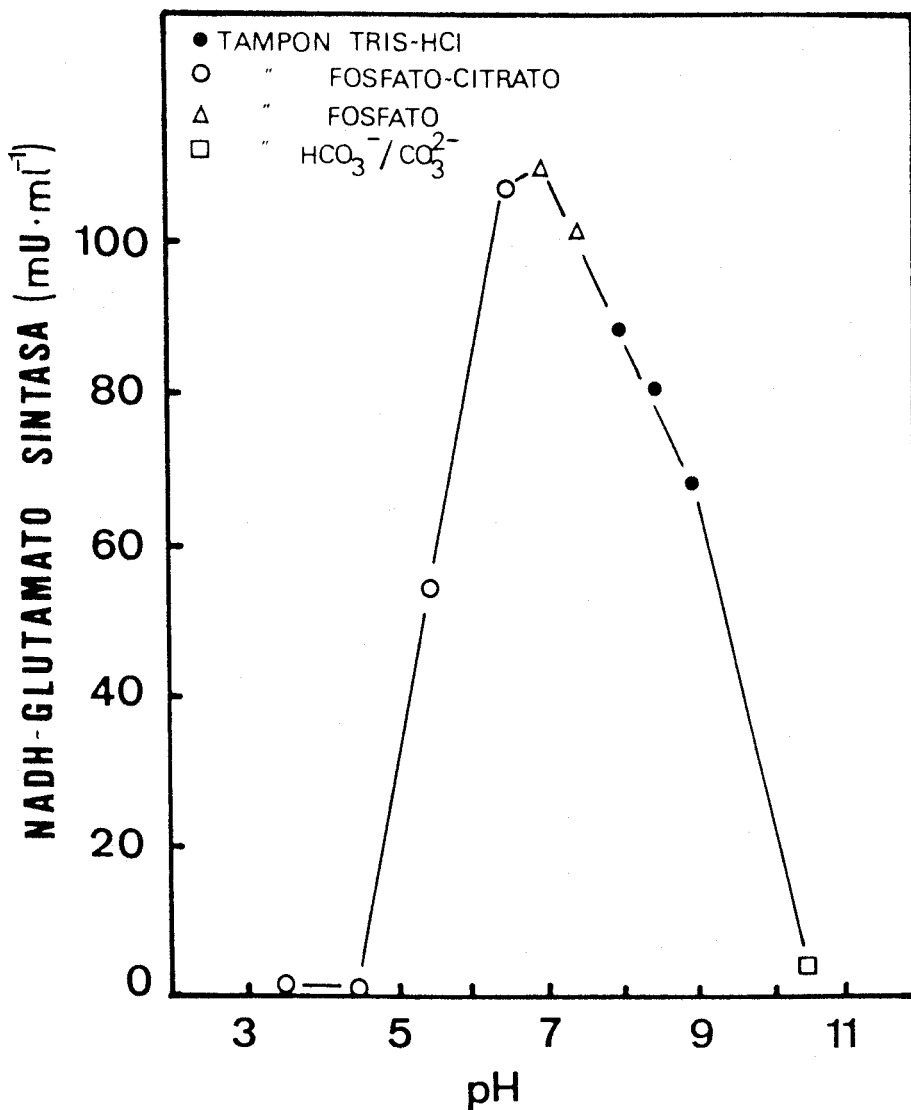


Figura 14. *pH* óptimo de la actividad NADH-glutamato sintasa de *C.reinhardtii*.

La actividad NADH-GOGAT se ensayó según el procedimiento estándar que se indica en Materiales y Métodos, excepto que, en cada caso, se utilizaron los tampones indicados a una concentración final de 100 mM.



senta un pH óptimo de trabajo, en tampón fosfato, igual a 7,0.

### III.E.2.5. Temperatura óptima

La actividad NADH-GOGAT se estudió a distintas temperaturas en un intervalo comprendido entre 15 y 55 °C. Se observó un marcado aumento de la actividad con la temperatura, alcanzándose un máximo a 40 °C, a partir del cual la actividad disminuía, lo que probablemente era debido a la desnaturalización térmica de la proteína (Fig. 15, A).

En la Fig. 15, B, se muestra la representación de Arrhenius de las velocidades máximas de reacción en función de la temperatura. Se observa que los puntos obtenidos se ajustan, en el intervalo de 15 a 40 °C, a una línea recta definida por la ecuación de Arrhenius:

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T}$$

donde K es la constante de velocidad de la reacción a la temperatura T (°K), que puede asumirse como la actividad enzimática máxima a esa temperatura; A es un factor constante relacionado con la frecuencia de colisiones;  $E_a$  es la energía de activación de la reacción; y R es la constante de los gases ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{°K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). La pendiente de esta recta es  $-E_a / 2,303 R$ , pudiéndose por tanto calcular el valor de la energía de activación a partir de la gráfica, resultando ser igual a  $38,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  para la reacción enzimática catalizada por la NADH-GOGAT.

El valor de  $Q_{10}$  obtenido entre 25 y 35 °C fue de 1,70.

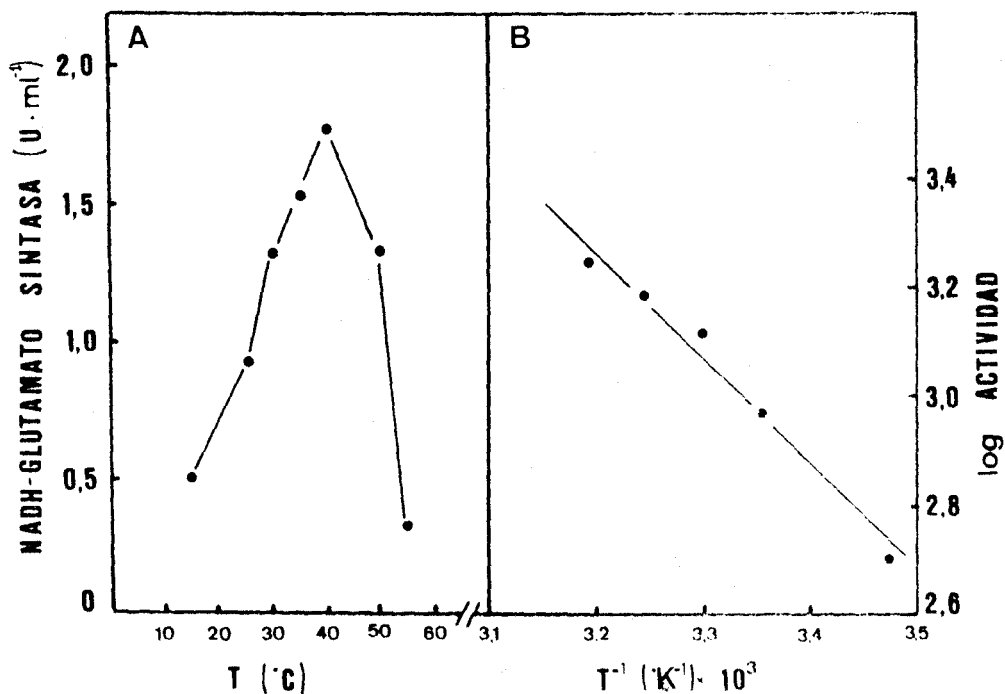


Figura 15. Temperatura óptima para el ensayo de la actividad NADH-glutamato sintasa de *C.reinhardtii*.

La actividad NADH-GOGAT se ensayó a las temperaturas indicadas, según se describe en Materiales y Métodos. En la parte A de la figura se representa la actividad obtenida para cada temperatura, mientras que en B, el logaritmo de la actividad frente al inverso de la temperatura en  $\text{°K}$ .

### III.E.2.6. Inhibidores

#### a) Inhibición por análogos de glutamina

La azaserina (o-diazoacetil-L-serina) y el DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucina), análogos estructurales de la glutamina, inhiben fuertemente las actividades NADH-GOGAT y MVH-GOGAT, pero no la NADH-ferricianuro reductasa, asociadas al complejo enzimático NADH-GOGAT. La Fig. 16 muestra el efecto de distintas concentraciones de azaserina sobre la actividad NADH-GOGAT. Otros análogos estructurales de glutamina como la albizziina (L-2-amino-3-ureido propiónico) ó el MSX (L-metionina-S-sulfoximina) no ejercieron ninguna acción inhibitoria sobre las actividades enzimáticas mencionadas.

#### b) Inhibición por pHMB

El pHMB (p-hidroxi-mercuribenzoato), reactivo típico de grupos sulfhidrilos, a una concentración de 5  $\mu$ M, inhibe de forma prácticamente total la actividad NADH-GOGAT, y significativamente la actividad MVH-GOGAT, sin afectar de forma importante a la actividad NADH-ferricianuro reductasa, más resistente a este tipo de inhibición. Por otra parte, una concentración 1 mM de pHMB inhibe casi totalmente todas las actividades del complejo enzimático (Fig. 17).

El efecto inhibitor del pHMB sobre la actividad NADH-GOGAT es mucho mayor cuando la enzima se incubaba previamente con este reactivo, en presencia de glutamina y 2-oxo glutarato (Tabla X).

#### c) Inhibición por compuestos quelantes de metales

La batofenantrolina, a una concentración 0,5 mM, inhibe significativamente la NADH-GOGAT (Fig. 18). Esta inhibe

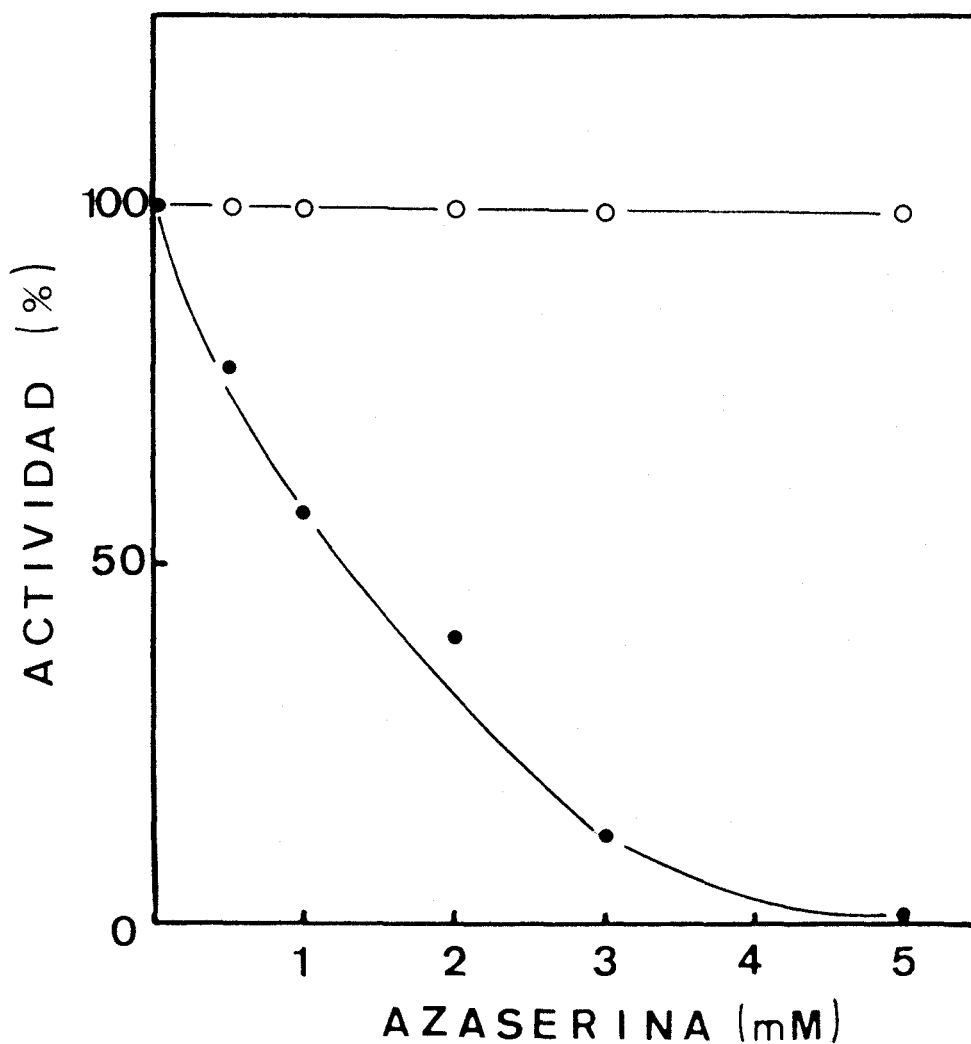


Figura 16. Inhibición por azaserina de la NADH-glutamato sintasa de C.reinhardii.

Se determinaron espectrofotométricamente las actividades NADH-GOGAT (●—●) y NADH-ferricianuro reductasa (○—○) en presencia de las concentraciones indicadas de azaserina, utilizando una preparación purificada de enzima. El 100 % de actividad fue, respectivamente, 3 y 6 U por mg.

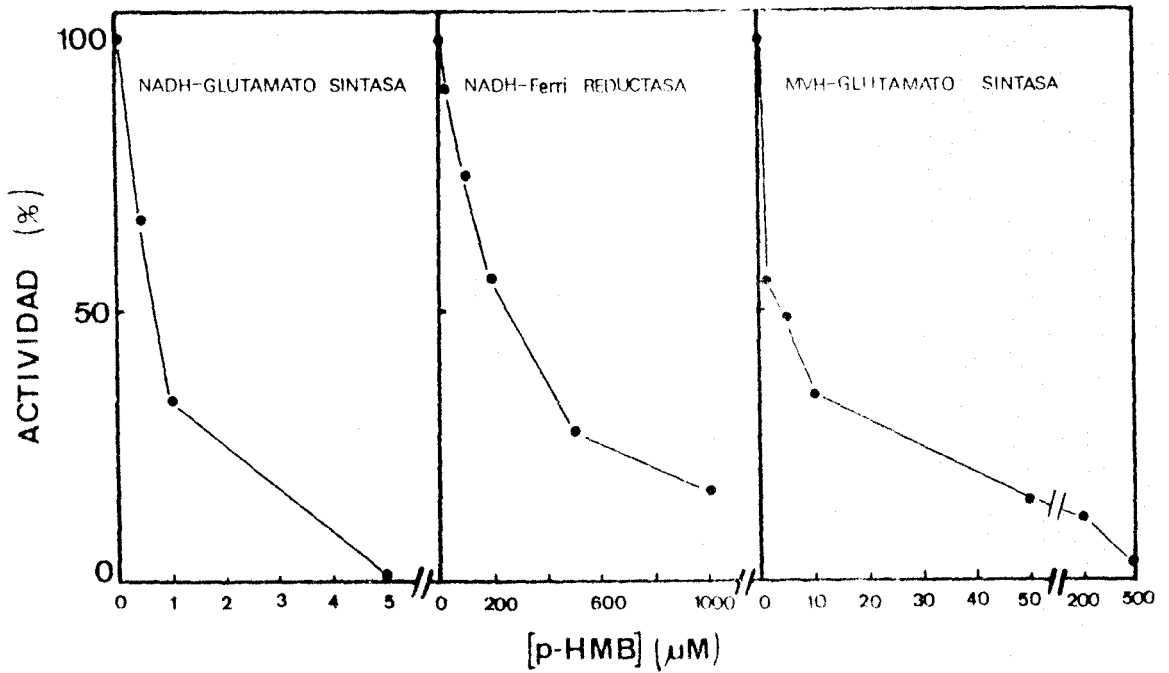


Figura 17. Inhibición por p-HMB de las actividades del complejo enzimático NADH-glutamato sintasa de *C. reinhardtii*.

Las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa se determinaron espectrofotométricamente, y la MVH-GOGAT colorimétricamente, pero incluyendo en la mezcla de reacción las concentraciones indicadas de p-HMB. El 100 % de actividad fue, respectivamente, 4,5, 9,0 y 1,6 U por mg.

TABLA X

EFFECTO DE LA GLUTAMINA Y EL 2-OXOGLUTARATO EN LA INHIBICION DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE *C. reinhardtii* por pHMB

pHMB  ( $\mu$ M)	Inhibición (%)			
	NADH-GOGAT		NADH-ferricianuro reductasa	
	A	B	A	B
100	100	100	25	85
0,5	33	75	0	0

Las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa se determinaron en presencia de las concentraciones indicadas de pHMB en la mezcla de reacción; los porcentajes de inhibición alcanzados son los que se indican en las columnas A. Las columnas B reflejan la inhibición conseguida cuando la enzima se preincubaba durante 5 min, a temperatura ambiente, con 5  $\mu$ mol de glutamina, 5  $\mu$ mol de 2-oxoglutarato y 100  $\mu$ mol de tampón fosfato, pH 7,5, antes de determinar la actividad correspondiente, en presencia del inhibidor. Las actividades originales, en ausencia de pHMB, eran de 4,5 y 9,0 U por mg para la NADH-GOGAT y la NADH-ferricianuro reductasa, respectivamente.

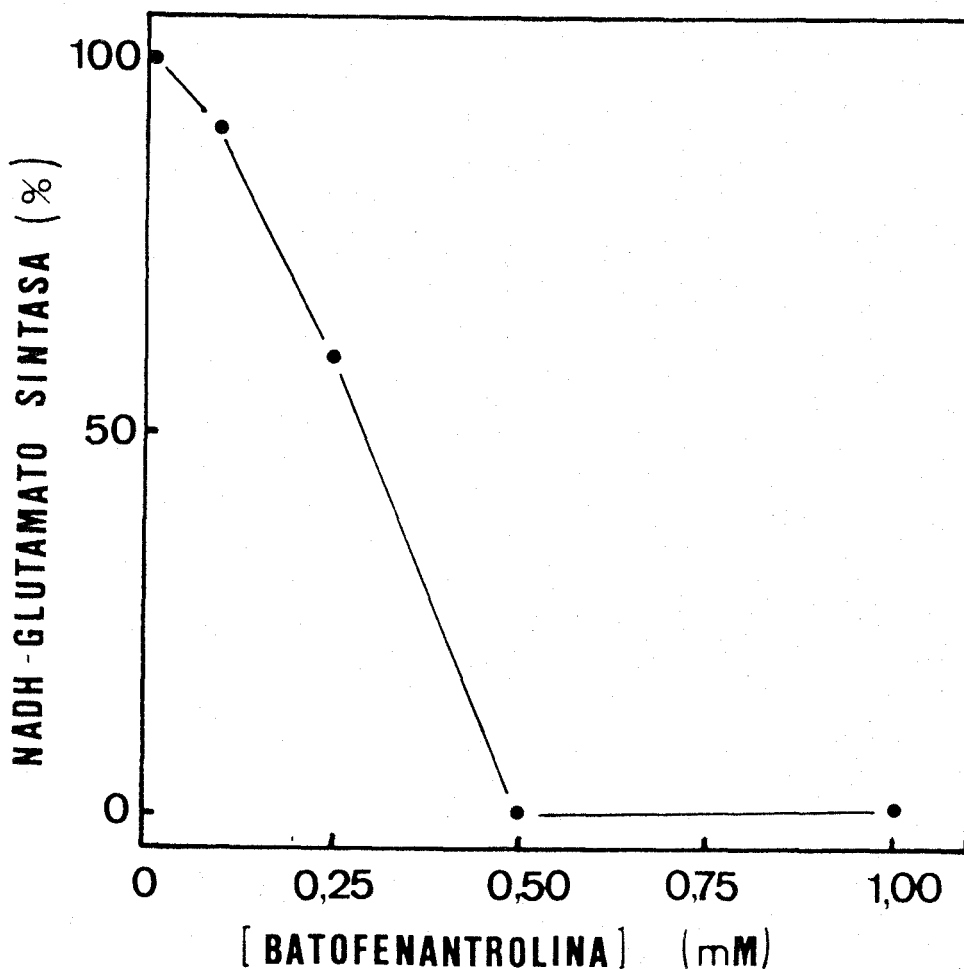


Figura 18. *Inhibición de la actividad NADH-glutamato sintasa de C.reinhardii por batofenentrolina.*

La actividad NADH-GOGAT se determinó espectrofotométricamente en presencia de diferentes concentraciones de batofenentrolina. El 100 % de actividad original, en ausencia de inhibidor, fue de 2,1 U por mg.

hibición se revierte completamente al cabo de 1-2 min.

Por el contrario, cianuro y cianato, a una concentración 1 mM, no inhiben ninguna de las actividades del complejo NADH-GOGAT.

#### d) Inactivación térmica

Todas las actividades del complejo NADH-GOGAT son muy sensibles al calentamiento a 45 °C durante 10-15 min. En la Fig. 19 se muestran las curvas de inactivación obtenidas para la actividad NADH-diaforasa y para la actividad NADH-GOGAT.

El calentamiento a 40 °C, por el contrario, tan sólo provoca un 20 % de inactivación de las distintas actividades.

#### III.E.2.7. Efecto de sustratos y productos sobre la actividad

Cuando se preincuba la NADH-GOGAT parcialmente purificada, durante 5-10 min a temperatura ambiente, con glutamina y 2-oxoglutarato, a las concentraciones del ensayo estándar, la actividad se estimula considerablemente, incrementándose de 4 a 6 veces.

La actividad NADH-GOGAT es sensible a la inhibición por algunos de sus sustratos. Así, concentraciones de NADH del orden del doble o triple de las del ensayo estándar, inhiben fuertemente la actividad (Tabla XI), si bien esta inhibición puede revertirse con el tiempo, en función de la concentración añadida de NADH. Similar inhibición por sustrato tiene lugar a altas concentraciones de 2-oxoglutarato, pero no de glutamina (Tabla XI).

Por su parte, la actividad NADH-ferricianuro reducta



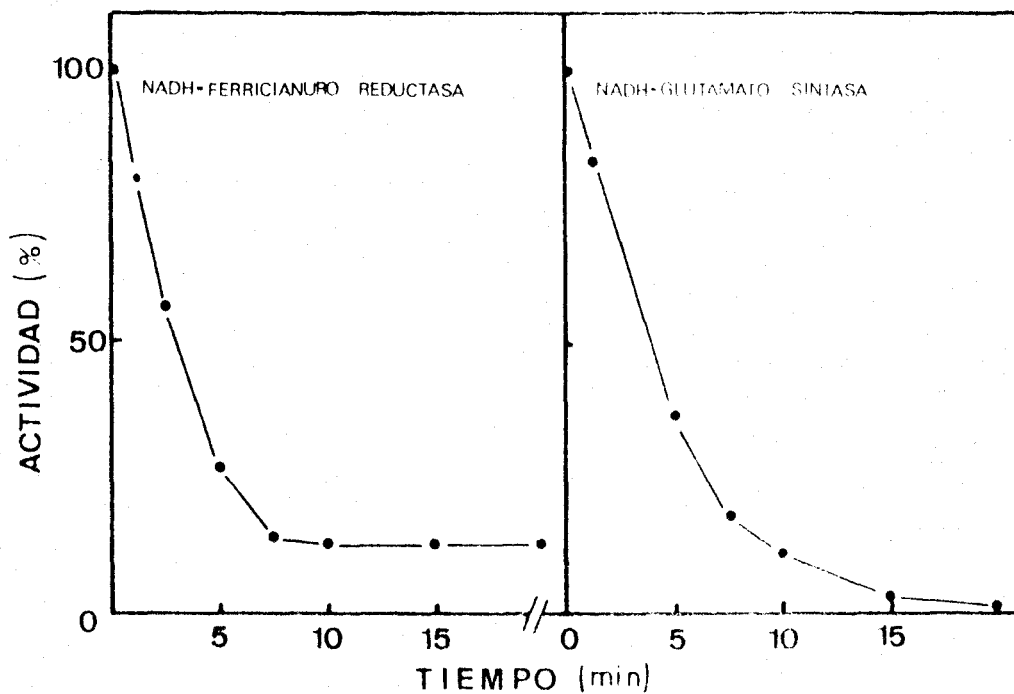


Figura 19. *Inactivación térmica de la NADH-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Una preparación purificada de NADH-GOGAT se incubó a 45 °C, y, a los tiempos indicados, se extraían sendas alícuotas para medir, según se describe en Materiales y Métodos, las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa. El 100 % de actividad fue, para ambos casos, 0,15 U por ml.

TABLA XI

INHIBICION POR SUSTRATOS DE LA NADH-  
GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardtii*

Sustrato añadido	Concentración (mM)	Actividad NADH-GOGAT (%)
Glutamina	20	93
Glutamina	100	95
2-oxoglutarato	10	64
2-oxoglutarato	20	55
2-oxoglutarato	40	43
2-oxoglutarato	100	7
NADH	0,15	50
NADH	0,30	14
NADH	0,45	0

La medida de la actividad se hizo espectrofotométricamente, según el ensayo estándar indicado en Materiales y Métodos, excepto que, en cada caso, se añadieron, además, los sustratos que se indican. El 100 % de actividad GOGAT, medida en condiciones estándar, fue de 0,9 U por mg.

sa de la enzima es también sensible a la inhibición por exceso de NADH y 2-oxoglutarato (resultados no mostrados).

En cuanto al efecto de los productos de la reacción enzimática sobre la actividad, resulta importante mencionar que el  $\text{NAD}^+$  es capaz de inhibir totalmente la actividad NADH-GOGAT, mientras que el glutamato lo hace tan sólo muy escasamente (Tabla XII).

### III.E.3. *Determinación de parámetros fisicoquímicos*

#### III.E.3.1. Radio de Stokes

El radio de Stokes de la NADH-GOGAT se determinó por filtración a través de una columna de Bio-Gel A-1.5 m, según se describe en Materiales y Métodos (apartado II.F.3). Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 20, y, a partir de ellos se determinó para la enzima un radio de Stokes de 8,9 nm.

#### III.E.3.2. Coefficiente de sedimentación

El coeficiente de sedimentación de la NADH-GOGAT se determinó por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa junto con proteínas marcadoras de coeficientes conocidos, tal y como se describe en el apartado II.F.2. La Fig. 21 muestra los resultados obtenidos, mediante los cuales se pudo calcular para la proteína un coeficiente de sedimentación de 9,9 S.

En la mencionada figura puede también observarse cómo a lo largo del gradiente tiene lugar una distribución absolutamente paralela de las actividades NADH-glutamato sintasa y NADH-ferricianuro reductasa, indicando nuevamente que se trata de actividades asociadas a la misma enzima.

TABLA XII

INHIBICION POR PRODUCTOS DE LA NADH-  
GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardii*

Producto añadido	Concentración (mM)	Actividad NADH-GOGAT (%)
Glutamato	10	74
Glutamato	50	76
NAD <sup>+</sup>	10	50
NAD <sup>+</sup>	20	24
NAD <sup>+</sup>	30	7

La actividad NADH-GOGAT se midió espectrofotométricamente según se indica en Materiales y Métodos, excepto que a la mezcla de reacción se añadía el producto correspondiente y a la concentración indicada. El 100 % de actividad, en las condiciones estándar, fue de 0,9 U por mg.

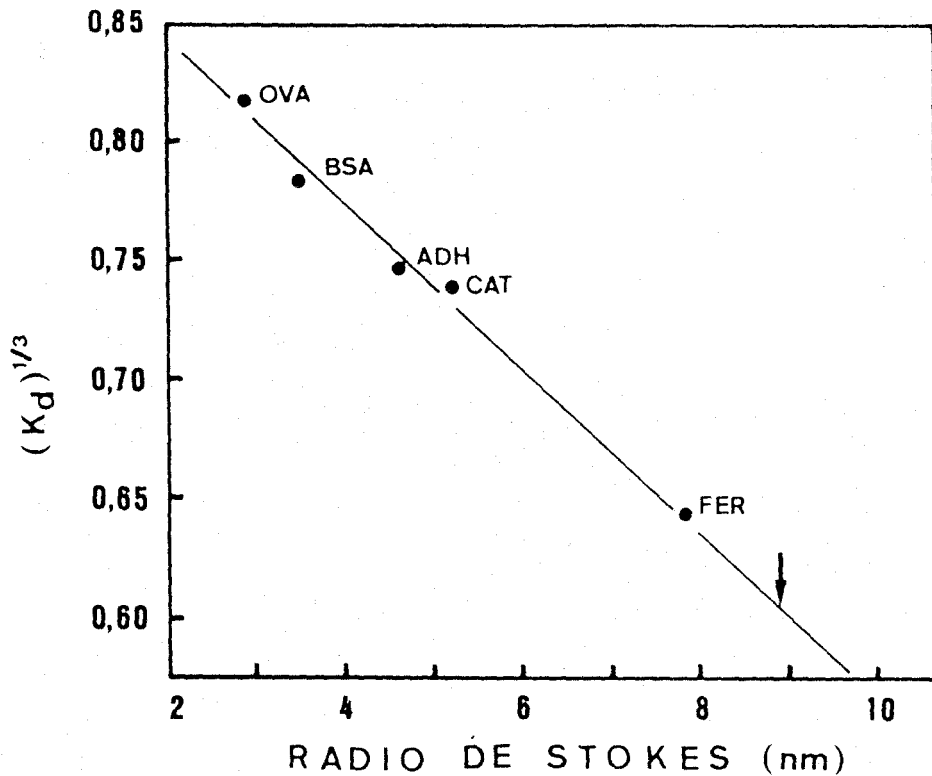


Figura 20. *Determinación del radio de Stokes de la NADH-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Las proteínas, de radios de Stokes conocidos, usadas como patrones fueron: ovoalbúmina de gallina (OVA, 2,75 nm), seroalbúmina bovina (BSA, 3,50 nm), alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH, 4,60 nm), catalasa bovina (CAT, 5,20 nm) y ferritina de bazo de caballo (FER, 7,80 nm). La flecha indica la localización de la NADH-GOGAT. Los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos.

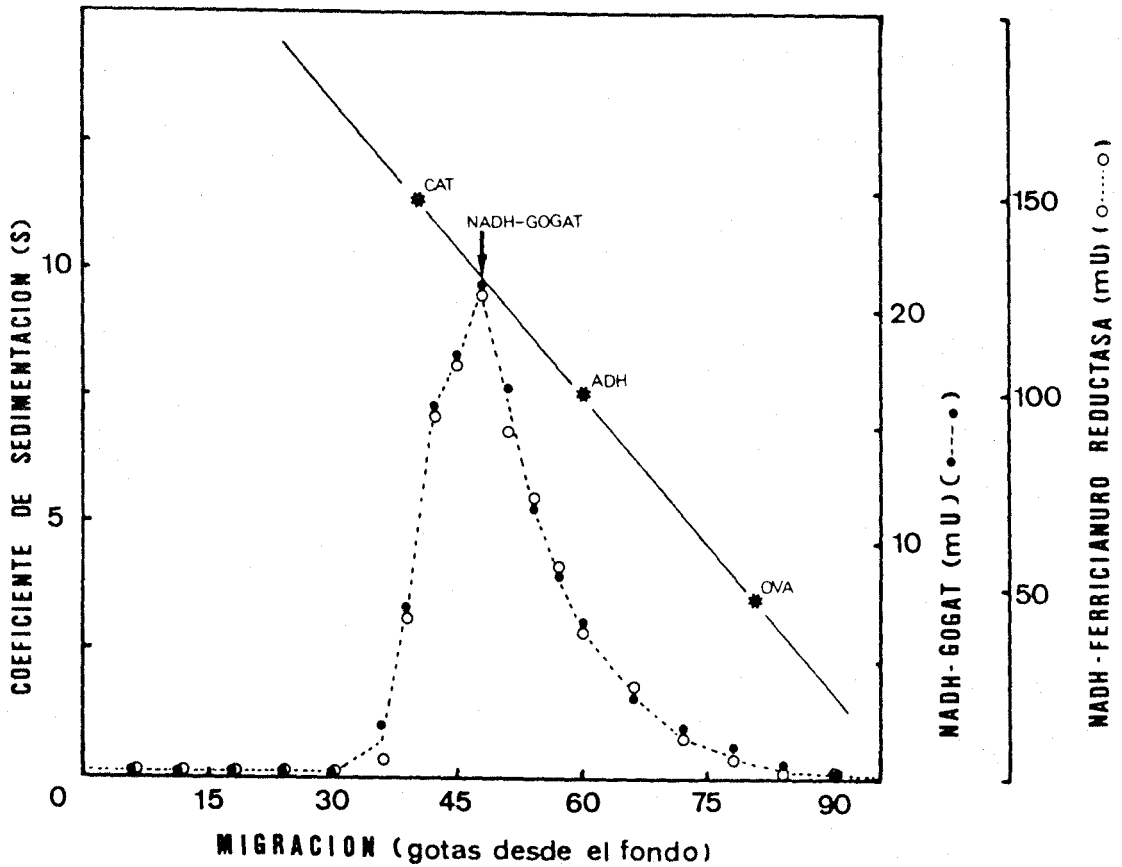


Figura 21. Determinación del coeficiente de sedimentación de la NADH-glutamato sintasa de *C. reinhardtii*.

Los patrones para la determinación del coeficiente de sedimentación fueron: catalasa bovina (CAT, 11,3 S), alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH, 7,6 S) y ovoalbúmina de gallina (OVA, 3,5 S). Para la determinación de las actividades NADH-GOGAT y NADH-ferricianuro reductasa en las distintas fracciones, se añadió a cada una de ellas 0,4 ml de tampón fosfato 10 mM, pH 7,5, y después de mezclar, se tomaron, respectivamente, alícuotas de 0,25 ml y 0,1 ml que se añadieron a las mezclas de reacción indicadas para cada actividad en Materiales y Métodos.

### III.E.3.3. Peso molecular

El peso molecular del complejo enzimático NADH-GOGAT se calculó a partir del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación hallados, haciendo para ello uso de la fórmula de Siegel y Monty (1965):

$$M = \frac{6 \pi N \eta a s}{1 - \bar{v} \rho}$$

donde M representa el peso molecular; N, el número de Avogadro;  $\eta$ , la viscosidad del medio (asumida como  $0,01 \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , valor de la viscosidad del agua a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ); a, el radio de Stokes en cm; s, el coeficiente de sedimentación en segundos;  $\bar{v}$ , el volumen específico parcial de la proteína (asumido como  $0,73 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , valor medio generalizado para las proteínas); y  $\rho$ , la densidad (asumida como  $0,998 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , valor de la densidad del agua a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

El peso molecular así obtenido fue de 368.000 .

### III.E.3.4. Coefficiente de fricción

Este parámetro se calculó mediante la fórmula

$$F = \frac{a}{\left( \frac{3 \bar{v} M}{4 \pi N} \right)^{1/3}}$$

donde F es el coeficiente de fricción, y el significado de las demás constantes y parámetros, así como su valor numérico, coincide con los mencionados en el apartado anterior.

El valor obtenido fue de 1,88, indicativo de una proteína no esférica.

#### III.E.4. *Espectro de absorción*

La preparación purificada de NADH-GOGAT obtenida exhibe el espectro de absorción mostrado en la Fig. 22 (curvas A y B), con máximos a 275 y 420 nm, y hombros a 375, 450 y 690 nm.

La adición a la preparación enzimática de unos cristales de NADH, que reduce a la enzima, provocó una disminución sensible de la absorción en la zona próxima a los 450 nm (Fig. 22, C). Dicha absorción se recuperaba casi completamente por la adición posterior de un exceso de glutamina y 2-oxoglutarato (Fig. 22, recuadro interno).

#### III.F. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA DE *Chlamydomonas reinhardtii*

##### III.F.1. *Comentarios sobre el método de purificación y criterio de pureza*

La Tabla XIII muestra, de forma resumida, una purificación típica de la ferredoxina de *C.reinhardtii*. Con ella se obtienen 25,2 mg de proteína pura a partir de 170 g de células (peso húmedo).

El tratamiento con sulfato de protamina es esencial para eliminar los ácidos nucleicos de los extractos que interfieren en los pasos posteriores puesto que, debido a su carga negativa, irían asociados siempre a las fracciones que contuvieran la ferredoxina, proteína de marcado carácter ácido. Después del tratamiento con protamina se consigue de esta forma disminuir muy considerablemente la absorbancia a 260 nm de la preparación.



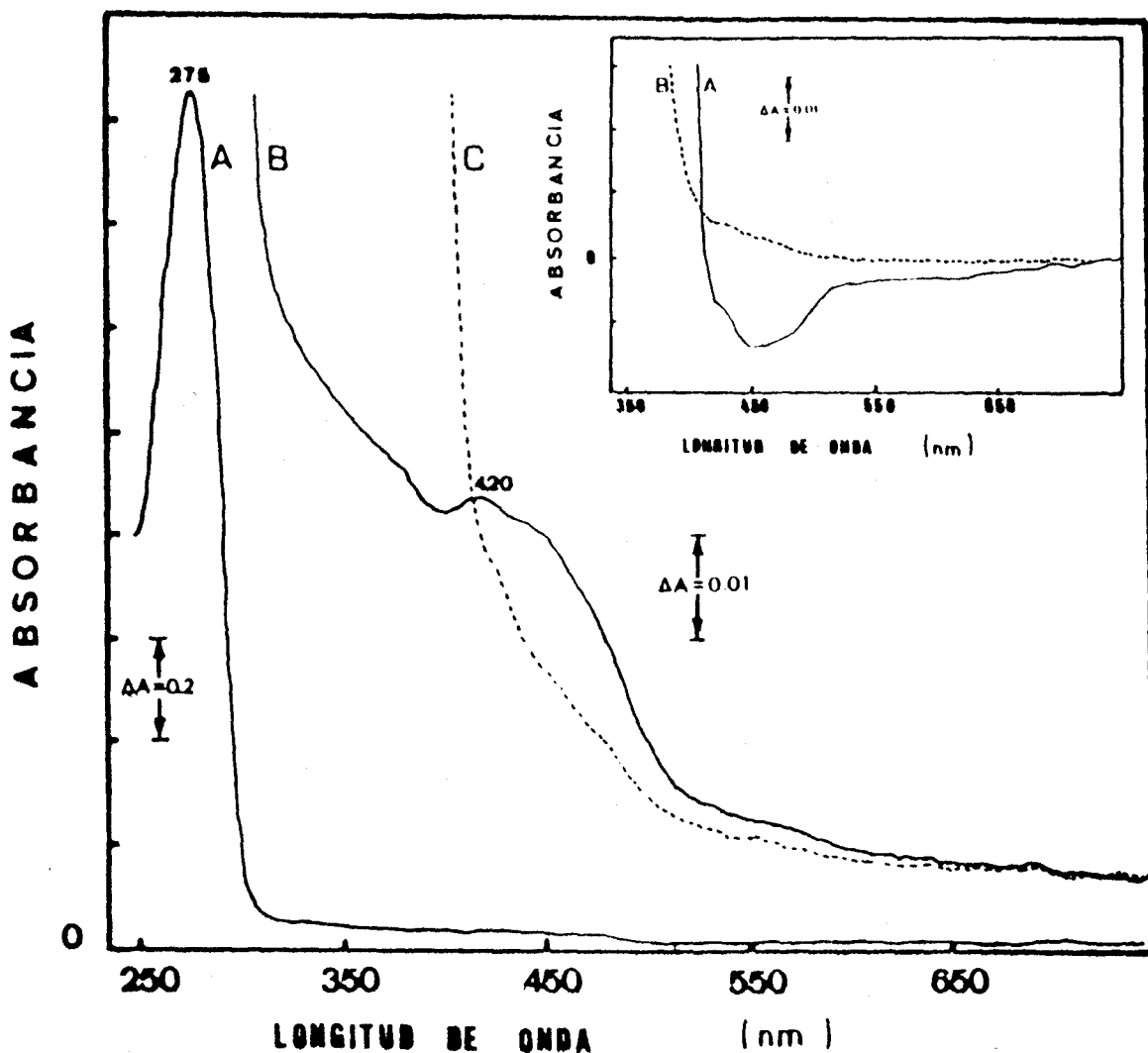


Figura 22. Espectros de absorción de la NADH-glutamato sintasa de *C. reinhardtii*.

La curva A representa el espectro de absorción correspondiente a una preparación de NADH-GOGAT (0,2 mg de proteína por ml, y 1,2 U por mg de proteína), purificada tal y como se describe en el texto. B refleja una región del mismo espectro, en escala expandida. C muestra el espectro obtenido después de la adición de unos cristallitos de NADH. En el recuadro interior, A, recoge el espectro diferencial de la enzima reducida por NADH frente a su forma oxidada, y, B, refleja el mismo espectro pero adicionando a la cubeta de muestra unos cristallitos de glutamina y 2-oxoglutarato.

TABLA XIII  
PURIFICACION DE LA FERREDOXINA DE *C. reinhardtii*

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	A <sub>420</sub>	A <sub>276</sub>	A <sub>260</sub>	$\frac{A_{420}}{A_{276}}$
Extracto crudo	820	3.331	0,71	9,73	14,91	0,07
1. Sobrenadante de protamina	820	2.404	0,52	4,15	5,53	0,13
2. Eluato de la 1ª DEAE-Sefacel	90	41	0,20	0,50	0,60	0,40
3. Eluato de la 2ª DEAE-Sefacel	30	25	0,41	0,81	0,70	0,51

Purificación efectuada a partir de 170 g (peso húmedo de células) ,por el procedimiento detallado en Materiales y Métodos.

La cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sefacel retiene poderosamente a la ferredoxina que forma una intensa banda de color marrón en la zona superior de la columna. Mediante la 2ª cromatografía en DEAE-Sefacel, se consigue eluir la ferredoxina en un único pico de color y de absorción a 280 nm, indicando la existencia de una única especie molecular de proteína.

Las preparaciones purificadas de ferredoxina mostraron una razón de absorción  $A_{420}/A_{276}$  de 0,51, y eran electroforéticamente homogéneas, tal y como se ponía de manifiesto al someter a electroforesis en gel de poliacrilamida altas cantidades de proteína (más de 120 µg), rindiendo siempre en los geles una única banda de proteína correspondiente a la banda marrón de la ferredoxina.

### III.F.2. *Determinación de parámetros fisicoquímicos*

#### III.F.2.1. Radio de Stokes y coeficiente de sedimentación

El radio de Stokes se determinó por filtración en gel, y el coeficiente de sedimentación por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, según se describe en los apartados II.F.3 y II.F.2, obteniéndose valores de 1,75 nm y 1,70 S respectivamente.

#### III.F.2.2. Peso molecular

El peso molecular de la ferredoxina se calculó por tres métodos diferentes:

- a) A partir del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación, de acuerdo con la fórmula de Siegel y Monty, descrita en el apartado III.E.3.3. Se obtuvo un valor de 12.200.

b) Por electroforesis en SDS (Fig. 23), en la cual la ferredoxina se localizó como una única banda de peso molecular 12.600, lo que indica que la proteína es un monómero de una sola cadena polipeptídica.

c) Mediante la composición de aminoácidos y el contenido en hierro y azufre lábil, que se detallan en el apartado III.F.3. Para este cálculo se sumaron los pesos moleculares de los 99 aminoácidos de que se compone la proteína, y se restó el peso de las 98 moléculas de agua que se liberan al unirse, mediante los enlaces peptídicos pertinentes, todos estos aminoácidos. Al valor así conseguido se sumó el peso debido al hierro y azufre inorgánicos presentes en la proteína, obteniéndose un peso molecular para la ferredoxina de 10.721.

A partir de los tres valores encontrados, se obtiene un peso molecular medio de 11.800.

#### III.F.2.3. Coeficiente de fricción

Utilizando la fórmula descrita en el apartado III.E.3.4 , y, a partir de los parámetros antes mencionados, se obtiene un coeficiente de fricción para la ferredoxina de *C. reinhardtii* de 1,16, lo que sugiere una forma aproximadamente esférica para la molécula.

#### III.F.2.4. Punto isoeléctrico

Cuando se somete una preparación de ferredoxina a isoelectroenfoque, ésta se concentra a lo largo del gradiente de pH establecido como una única banda a un valor de pH de 3,30, que corresponde a su punto isoeléctrico (Fig. 24). Este valor concuerda con el fuerte carácter ácido de la proteína, antes también mencionado, y que se debe a su peculiar composición de aminoácidos (apartado III.F.3 ).

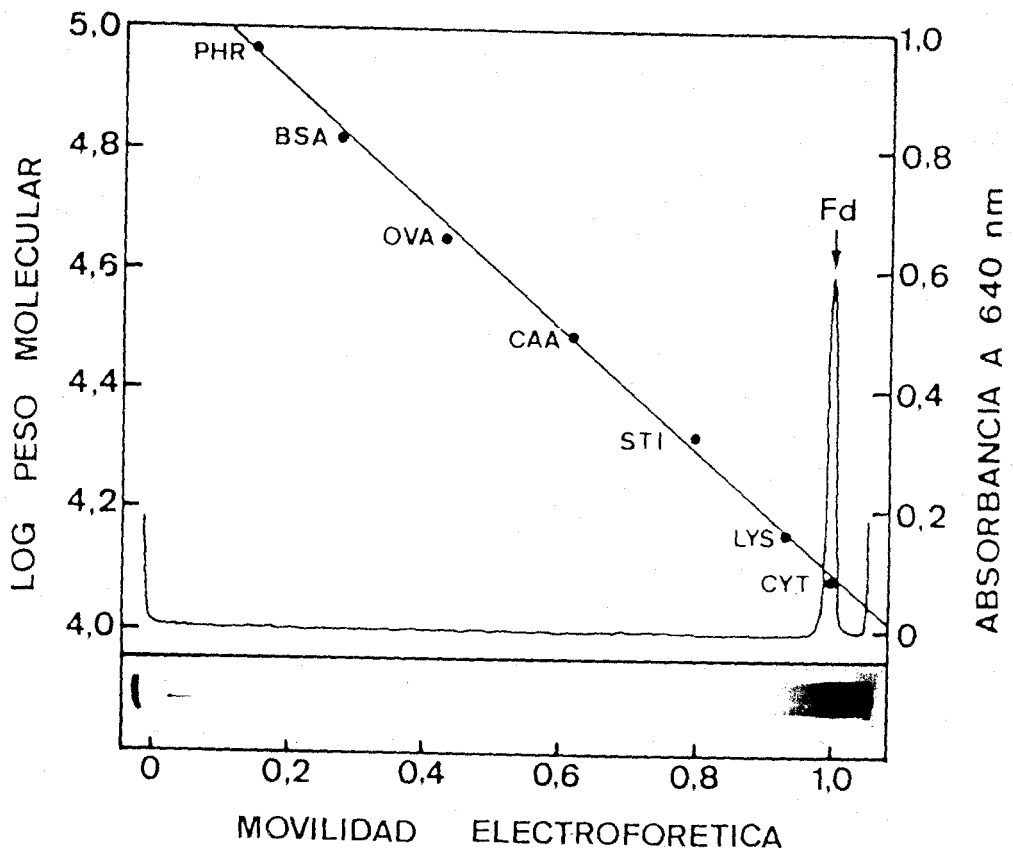


Figura 23. Determinación del peso molecular de la ferredoxina de *C.reinhardii* por electroforesis en SDS.

La ferredoxina y/o las proteínas patrones, de pesos moleculares conocidos, se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes con SDS, en geles al 10 % de acrilamida, según se describe en Materiales y Métodos. Los patrones eran: fosforilasa *b* (PHR, 92.500), se roalbúmina bovina (BSA, 66.200), ovalbúmina (OVA, 45.000), anhidrasa carbónica (CAA, 31.000), inhibidor de la tripsina de semilla de soja (STI, 21.500), lisozima (LYS, 14.500) y citocromo *c* de corazón de caballo (CYT, 12.500). La parte inferior de la figura muestra el gel con ferredoxina, teñido para proteína, después de la electroforesis. También se muestra el densitograma del gel, registrado a 640 nm.

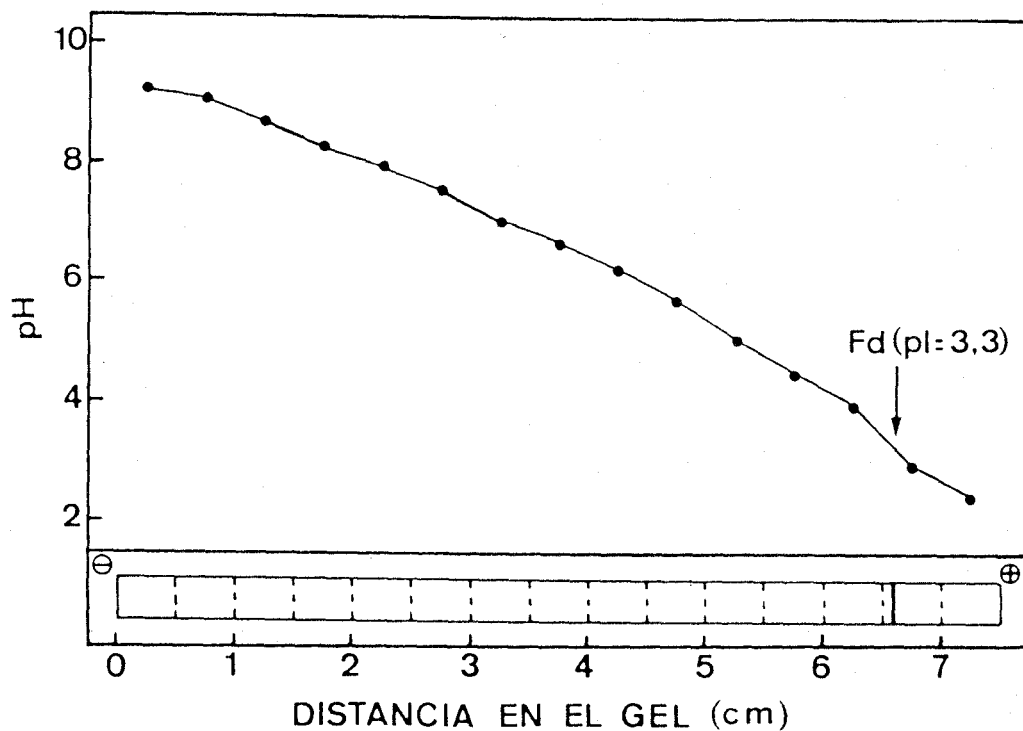


Figura 24. *Determinación del punto isoeléctrico de la ferredoxina de C.reinhardtii por electroenfoque.*

50  $\mu$ g de ferredoxina purificada se sometieron a isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, según se detalla en Materiales y Métodos. En la parte inferior se muestra un esquema del gel, troceado en fracciones de 0,5 cm, y se representa la banda de ferredoxina aparecida.

### III.F.3. *Composición*

#### III.F.3.1. Aminoácidos

La composición de aminoácidos de la ferredoxina de *C. reinhardii* se muestra en la Tabla XIV, donde puede apreciarse que contiene 99 aminoácidos por molécula, que incluyen a todos los aminoácidos proteínogénicos.

Es interesante resaltar el alto contenido en alanina, así como la preponderancia de aminoácidos ácidos sobre los básicos, que justifica el comportamiento de la ferredoxina en la cromatografía en DEAE-Sefacel e isoelectroenfoque, antes mencionados.

El volumen específico aparente de la ferredoxina se calculó a partir de su composición de aminoácidos (Schachman, 1957), según se describe en la Tabla XV. El valor obtenido fue de  $0,735 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ , dato utilizado para determinar su peso molecular (apartado III.F.2.2 ).

#### III.F.3.2. Grupos prostéticos

La ferredoxina de *C. reinhardii* presenta una agrupación sulfoférica del tipo {2Fe-2S}, característica de las ferredoxinas de organismos fotosintéticos ( *tipo planta* ). Las evidencias que se han obtenido con respecto a la existencia de este tipo de agrupación, se pueden resumir en los siguientes aspectos:

- a) Espectros de absorción de la ferredoxina oxidada y reducida. La ferredoxina purificada muestra, en su estado nativo, un espectro de absorción con máximos a 276, 330, 420 y 460 nm, así como un hombro a 284 nm (Fig. 25, A). La adición en condiciones anaeróbicas de pequeñas cantidades de ditionito sódico, provoca la reducción rápida de la ferredoxina, ori

TABLA XIV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE  
LA FERREDOXINA DE *C.reinhardii*

Aminoácido	número de residuos por molécula de ferredoxina	
	<i>Medidos</i>	<i>Deducidos</i>
Lys	4,52	5
His	0,62	1
Arg	2,13	2
Asx	10,19	10
Thr	8,69	9
Ser	8,44	8
Glx	10,89	11
Pro	2,28	2
Gly	9,25	9
Ala	14,11	14
Cys	4,19	4
Val	4,76	5
Met	0,92	1
Ile	2,56	3
Leu	6,88	7
Tyr	5,02	5
Phe	2,28	2
Trp	1,04	1
		TOTAL 99

Se procedió según se describe en Materiales y Métodos



TABLA XV

DETERMINACION DEL VOLUMEN ESPECIFICO

APARENTE DE LA FERREDOXINA DE *C.reinhardtii*

Aminoácido	R <sub>i</sub>	M <sub>i</sub>	W <sub>i</sub> (%)	V <sub>i</sub> (ml·g <sup>-1</sup> )	V <sub>i</sub> ·W <sub>i</sub> (%)
Lys	4,52	146	5,592	0,82	4,585
His	0,62	155	0,814	0,67	0,545
Arg	2,13	174	3,141	0,70	2,199
Asx	10,19	133	11,485	0,59	6,776
Thr	8,69	119	8,764	0,70	6,135
Ser	8,44	105	7,510	0,63	4,731
Glx	10,89	147	13,566	0,66	8,954
Pro	2,28	115	2,222	0,76	1,689
Gly	9,25	75	5,879	0,64	3,763
Ala	14,11	89	10,642	0,74	7,875
Cys	4,19	121	4,297	0,63	2,707
Val	4,76	117	4,720	0,86	4,059
Met	0,92	149	1,162	0,75	0,872
Ile	2,56	131	2,842	0,90	2,558
Leu	6,88	131	7,638	0,90	6,874
Tyr	5,02	181	7,700	0,71	5,467
Phe	2,28	165	3,188	0,77	2,455
Trp	1,04	204	1,798	0,74	1,331
			$\Sigma W_i = 100$		$\Sigma (V_i \cdot W_i) = 73,58$

$$V_p = \frac{\Sigma (V_i \cdot W_i)}{\Sigma W_i} = 0,735 \text{ ml g}^{-1}$$

R<sub>i</sub> representa el número de residuos del aminoácido por molécula de ferredoxina.

M<sub>i</sub> y V<sub>i</sub> representan, respectivamente, el peso molecular y volumen específico de cada aminoácido.

W<sub>i</sub> representa el porcentaje (P/P) de cada aminoácido en la molécula de ferredoxina (W<sub>i</sub> = M<sub>i</sub> · R<sub>i</sub> / 11.800).

V<sub>p</sub> representa el volumen específico aparente de la ferredoxina.

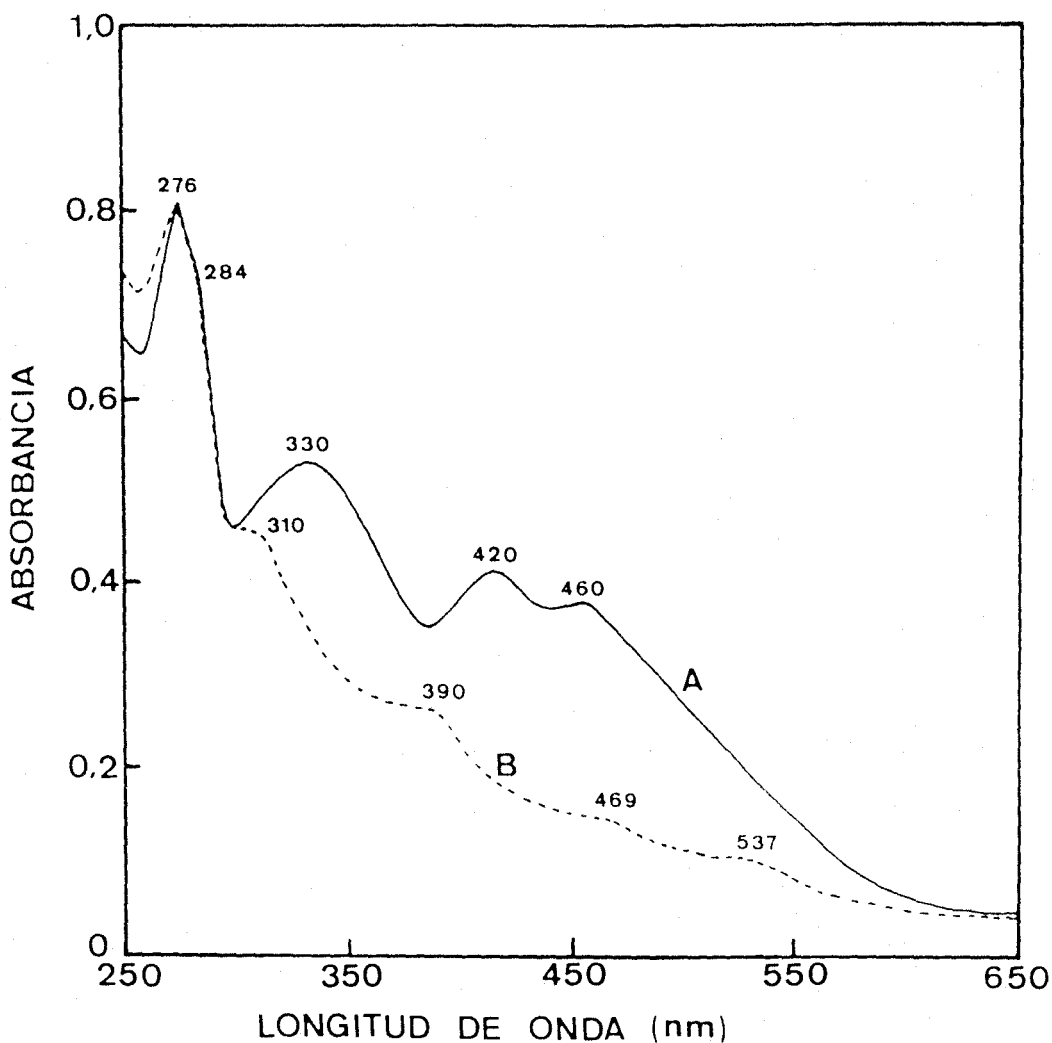


Figura 25. Espectros de absorción de la ferredoxina de *C. reinhardtii*

A, espectro de absorción, a + 270 mV, de la ferredoxina purificada (0,66 mg por ml) en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5. B, espectro de absorción, a -470 mV, de la ferredoxina reducida con 0,1  $\mu$ mol de ditionito preparado anaeróbicamente en tampón bicarbonato 0,5 M, pH 8,3.

ginando la desaparición de los picos a 330, 420 y 460 nm, junto con la aparición de nuevos hombros a 310, 390, 469 y 537 nm (Fig. 25, B). La ferredoxina reducida es autooxidable, puesto que se puede recuperar el espectro de absorción nativo por la oxidación con aire (resultado no mostrado). Asumiendo un peso molecular de 11.800, se calculó un coeficiente de extinción, a 420 nm, de  $8,4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

- b) Espectros de Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR). La ferredoxina reducida presenta el espectro de EPR que se muestra en la Fig. 26, con valores de  $g$  a 2,05; 1,96 y 1,88, indicativos de una agrupación sulfoférica de {2Fe-2S} con un electrón desapareado, en un estado de oxidación +1.
- c) Determinación analítica del contenido en hierro y sulfuro lábil. El análisis cuantitativo arrojó un valor medio de 1,99 átomos de hierro y 1,55 de sulfuro lábil por molécula de ferredoxina, indicativos de la presencia de un centro {2Fe-2S}. Este grupo se uniría a la proteína a través de los cuatro residuos cisteínicos que ésta posee (ver Tabla XIV).

#### III.F.4. Medida del potencial normal

El potencial normal de la ferredoxina de *C.reinhardii* se determinó mediante una titulación reductiva que se llevó a cabo añadiendo pequeñas alícuotas de una solución de ditionito, y registrando los cambios de absorbancia producidos, que permitían calcular el porcentaje de ferredoxina oxidada, a la vez que el potencial redox. La Fig. 27 muestra la representación obtenida de la cantidad de ferredoxina oxidada frente al potencial redox.

El valor de potencial normal en condiciones estándar, a pH 7,5 ( $E'$ ) obtenido fue de -410 mV.

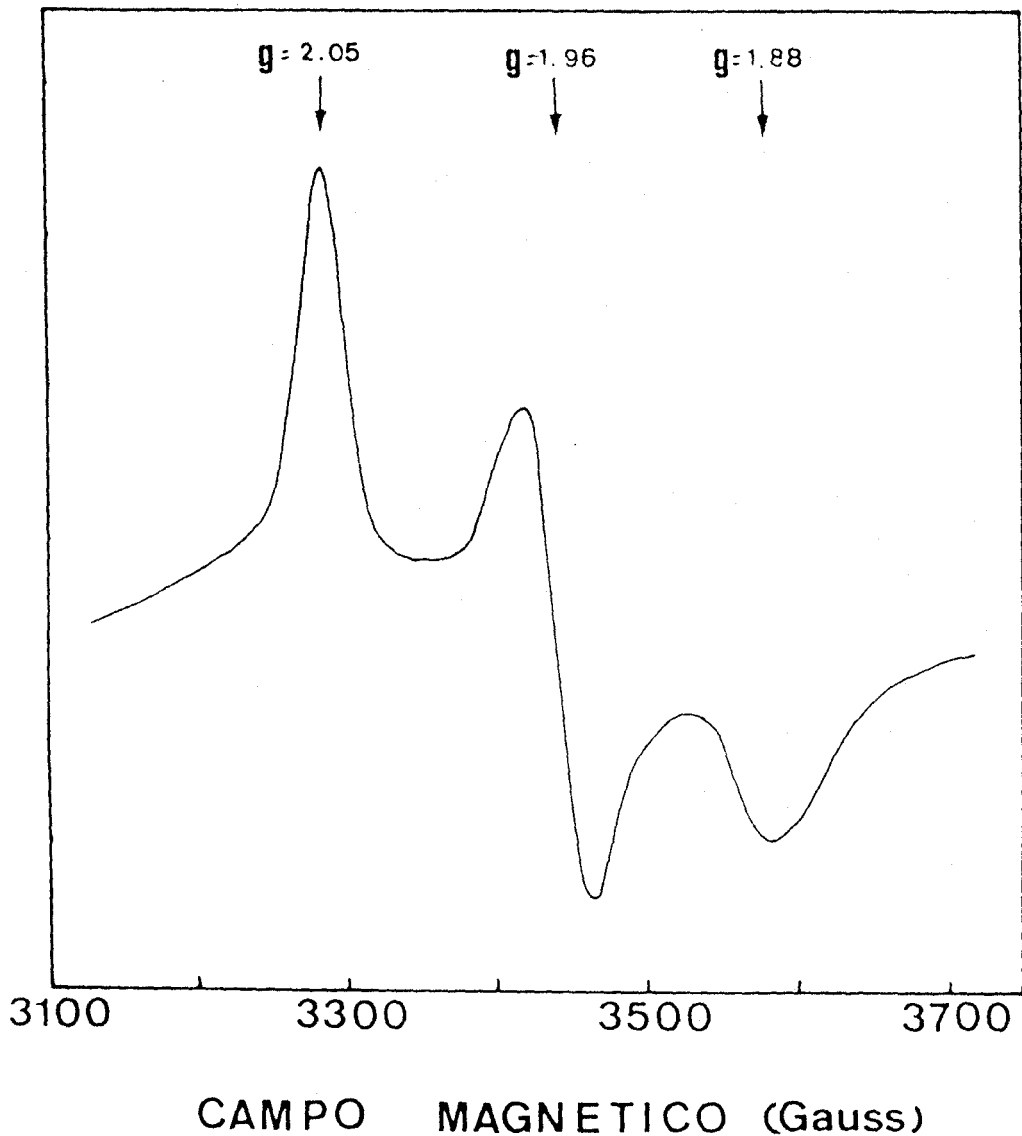


Figura 26. *Espectro de EPR de la ferredoxina reducida de C.reinhardtii.*

Una preparación de ferredoxina 85  $\mu\text{M}$ , en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, se redujo con cristales de ditionito en condiciones anaeróbicas. El espectro de EPR se registró en las siguientes condiciones instrumentales: frecuencia de microondas, 9,404 GHz; intensidad de microondas, 20 dB; amplitud de modulación, 10 G; ganancia  $2 \cdot 10^5$ ; temperatura, 10  $\text{O K}$ .

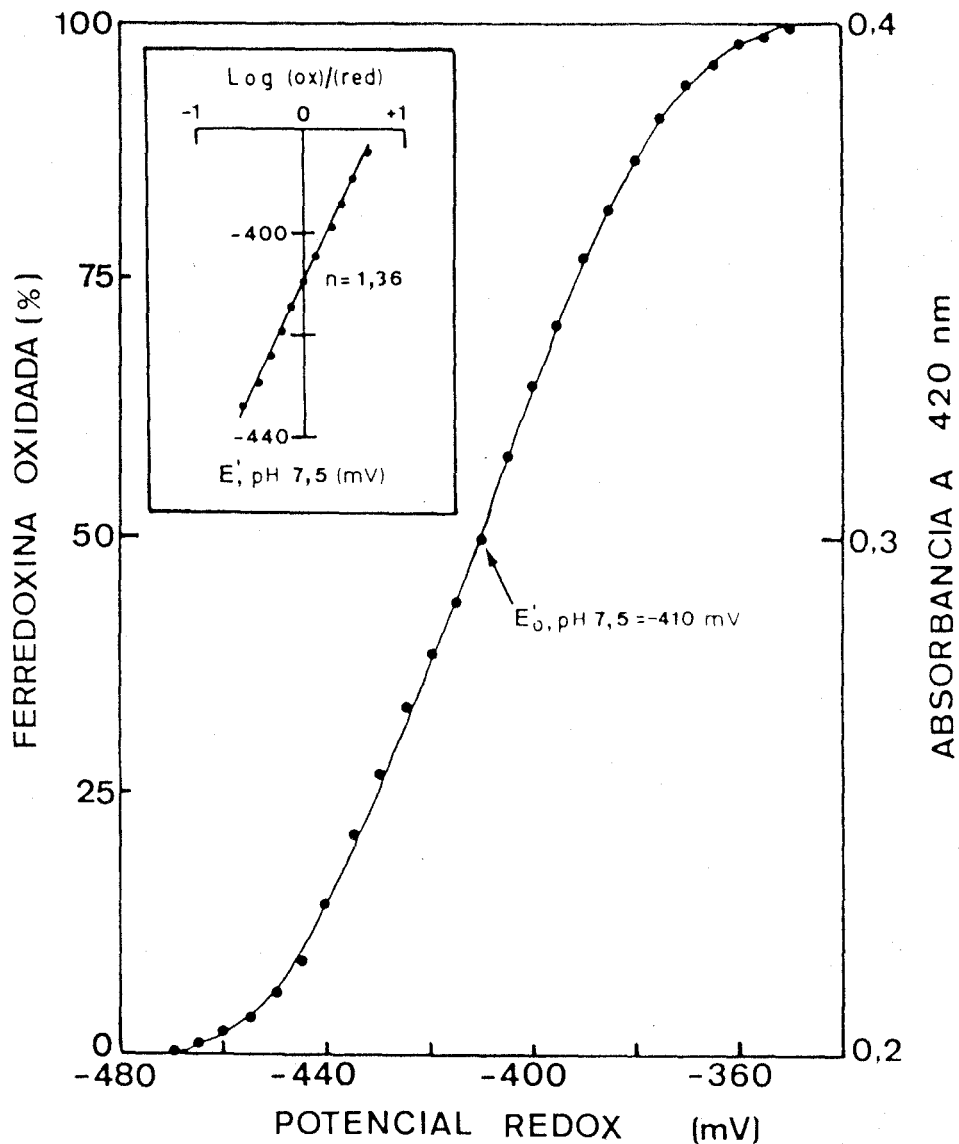


Figura 27. *Titulación reductiva de la ferredoxina de C.reinhardtii.*

Una muestra de 3 ml, conteniendo ferredoxina 56  $\mu\text{M}$ , en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, y los mediadores redox, se sometió a una titulación reductiva con ditionito sódico, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. El recuadro interno corresponde a la representación de Nernst de los datos experimentales.

Mediante la representación de Nernst de los datos obtenidos (Fig. 27, recuadro interno), se calculó una estequiometría de 1,36 electrones transferidos por molécula de proteína, lo que indica que la ferredoxina actúa como un transportador redox de 1 electrón.

En la Tabla XVI se resumen las propiedades físicas y químicas estudiadas de la ferredoxina de *C.reinhardtii*.

### III.G. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA-GLUTAMATO SINTASA DE *Chlamydomonas reinhardtii*

#### III.G.1. *Comentarios sobre el método de purificación y criterio de pureza*

El apartado II.E.3 de Materiales y Métodos describe el procedimiento utilizado para purificar la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*, a partir de extractos crudos obtenidos por congelación-descongelación en nitrógeno líquido. A continuación comentamos los resultados obtenidos en cada uno de los pasos efectuados:

- a) Tratamiento con sulfato de protamina. El efecto de este paso ya se ha comentado en el apartado III.E.1. La proporción óptima de protamina para clarificar los extractos, sin afectar a la purificación de la Fd-GOGAT, resultó ser la misma que para la NADH-GOGAT (apartado III.E.1). La recuperación de la actividad Fd-GOGAT tras este tratamiento era de un 70-80 %
- b) Primera cromatografía en DEAE-Sefacel. Esta etapa resultó de gran utilidad práctica al inicio de la purifica-

TABLA XVI  
 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LA  
 FERREDOXINA PURIFICADA DE *C. reinhardtii*

---

Radio de Stokes (nm)	1,75
Coefficiente de sedimentación (S)	1,70
Peso molecular	
- a partir del radio de Stokes y coeficiente de sedimentación	11.200
- por electroforesis en SDS	12.600
- a partir de la composición de aminoácidos	10.700
valor medio	11.800
Coefficiente de fricción	1,16
$E_{420}$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	8,4
$A_{420}/A_{276}$	0,51
Punto isoeléctrico	3,30
$E_6$ (pH 7,5) (mV)	- 410
Volumen específico aparente ( $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ )	0,735
Número de electrones transferibles	
- valor medido	1,36
- valor deducido	1
Sulfuro inorgánico lábil ( $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de proteína)	
- valor medido	1,55
- valor deducido	2
Hierro (átomo-g $\cdot\text{mol}^{-1}$ de proteína)	
- valor medido	1,99
- valor deducido	2
Valores de $g$ en EPR	2,05
	1,96
	1,88

---

ción, dado que con ella se conseguía no sólo la purificación de la Fd-GOGAT, sino también su separación de la NADH-GOGAT y de la ferredoxina, tal y como se mencionó en el apartado III.D.

- c) Segunda cromatografía en DEAE-Sefacel. Este segundo tratamiento de separación por intercambio iónico, conseguía separar un mayor número de proteínas asociadas con ella que en la cromatografía anterior, sin afectar significativamente a la recuperación. La Fig. 28 recoge un perfil de elución de esta cromatografía.
  
- d) Cromatografía en hidroxilapatito. Esta etapa permite dividir la preparación en varias fracciones proteicas, de las cuales, tan sólo una lleva asociada la actividad Fd-GOGAT. La Fig. 29 recoge el perfil de elución de proteína y actividad Fd-GOGAT de una cromatografía típica en hidroxilapatito.
  
- e) Cromatografía en Ferredoxina-Sefarosa. La cromatografía de afinidad en Ferredoxina-Sefarosa resultó ser una pieza clave en la purificación de la Fd-GOGAT de *Chlamydomonas*, dado que la enzima se retenía en la columna de forma específica, debido a su afinidad por la ferredoxina, al contrario de lo que sucedía con el resto de las proteínas. La Fig. 30 muestra un cromatograma de esta etapa, en el que también puede observarse la correlación existente entre la elución de la actividad enzimática y de la absorción a 437 nm, indicativa de la presencia de flavina en la preparación.

Una purificación típica como la que hemos descrito para la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*, se recoge de forma resumida en la Tabla XVII, en la que puede apreciarse que este método permite obtener del orden de 6 mg de proteína purificada a partir de 220 g de células (peso húmedo), con un factor



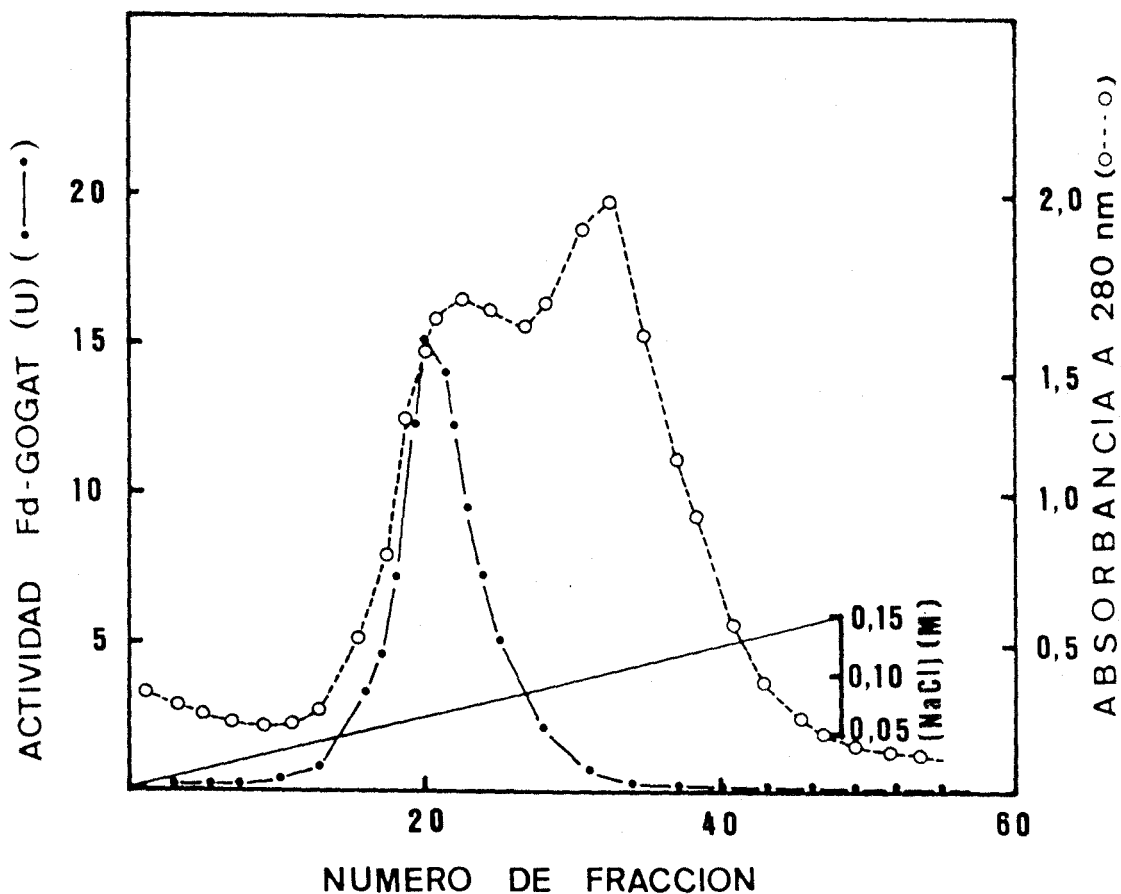


Figura 28. *Elución de la Fd-glutamato sintasa de la segunda cromatografía en DEAE-Sefacel.*

La elución se llevó a cabo, según se detalla en Materiales y Métodos, aplicándose 800 ml de un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M, y recogiendo fracciones de 8 ml, a las que se determinaba la actividad Fd-GOGAT con alícuotas de 0,2 ml, así como la absorbancia a 280 nm.

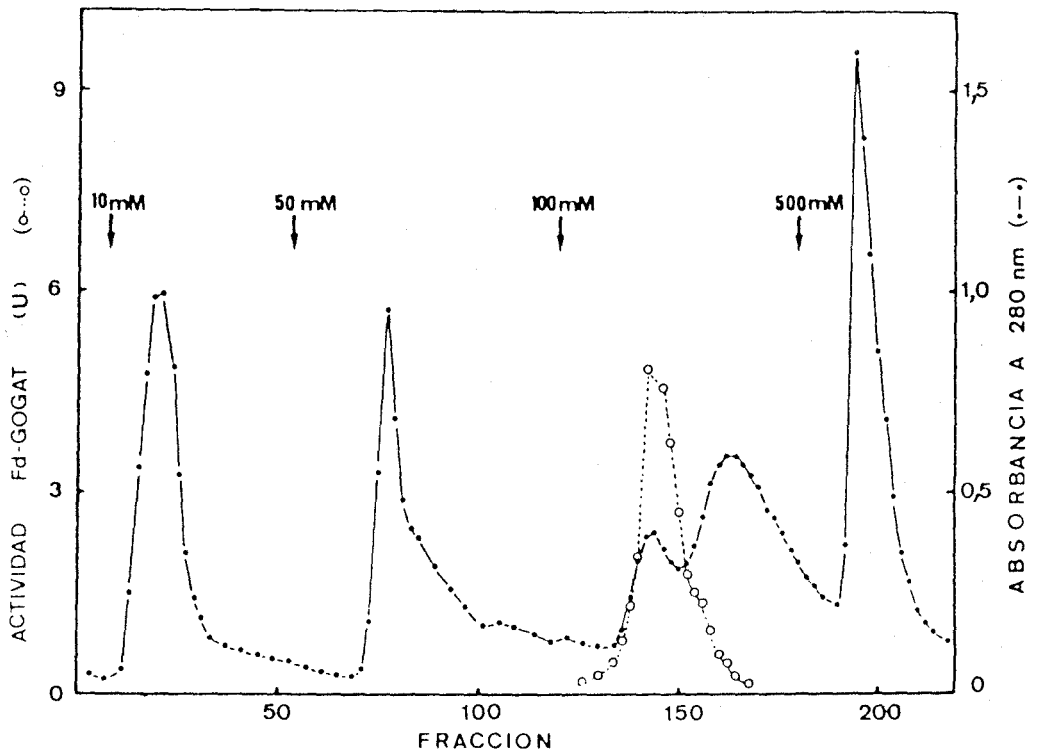


Figura 29. Perfil de elución de la Fd-glutamato sintasa de *C. reinhardii* retenida en una columna de hidroxilapatito.

La elución de las proteínas adsorbidas en la columna, se llevó a cabo, de forma discontinua, mediante tampones de fosfato potásico, de pH 7,5, de diferentes concentraciones, tal y como indican las flechas, y suplementados con DTE 0,2 mM y EDTA 0,5 mM. Se recogieron fracciones de 3 ml a las que se determinó la absorción a 280 nm, y la actividad Fd-GOGAT.

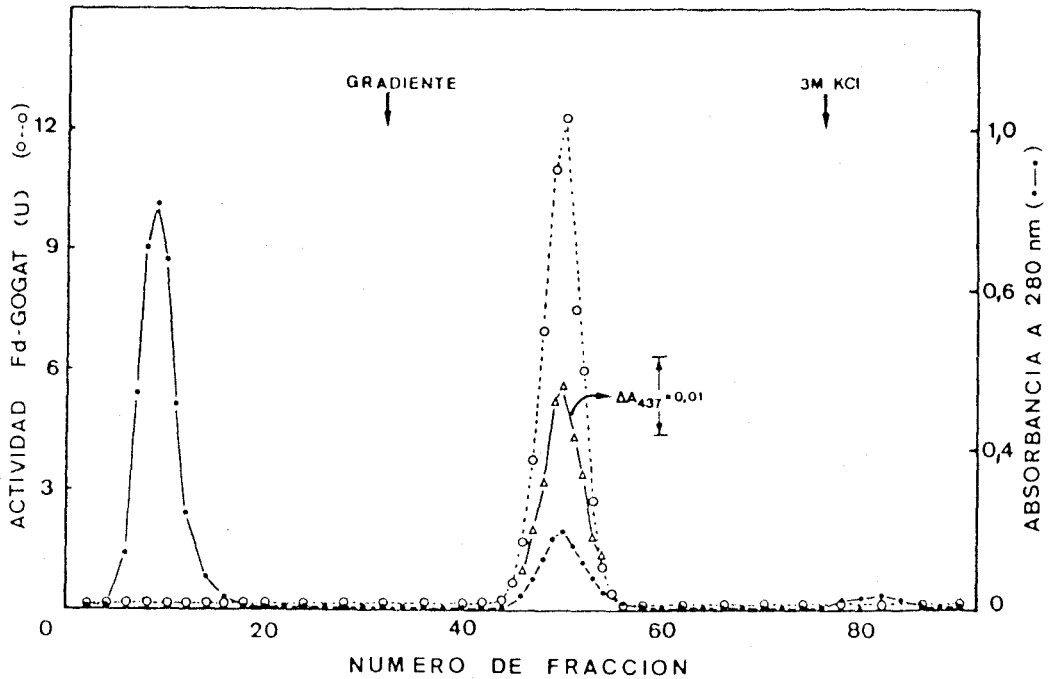


Figura 30. *Cromatografía de afinidad en Ferredoxina-Sefarosa de la Fd-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Se procedió según se indica en Materiales y Métodos. Las flechas indican los momentos de adición del gradiente de NaCl, y del KCl 3 M, respectivamente. Se recogieron fracciones de 2 ml a las que se determinó la absorción a 280 y 437 nm, así como la actividad Fd-GOGAT.

TABLA XVII

PURIFICACION DE LA Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C. reinhardtii*

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Extracto crudo	1.060	4.738	214,5	0,045	100
1.Sobrenadante de protamina	1.150	2.518	167,0	0,066	78
2.Eluato de 1a DEAE-Sefacel	240	853	118,0	0,140	55
3.Eluato de 2a DEAE-Sefacel	150	437	108,0	0,250	51
4.Eluato de hidroxilapatito	120	124	84,0	0,680	39
5.Eluato de Fd-Sefarosa	25	6	39,0	6,500	18

El procedimiento de purificación, la medida de la actividad y la determinación de proteína se efectuaron tal y como se especifica en Materiales y Métodos.

de purificación de 144 veces y una recuperación final del 18 %. La actividad específica de la preparación obtenida era de  $6,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , lo que corresponde, asumiendo el peso molecular descrito en el apartado III.F.3, a una actividad molar de 949 moles de glutamato producido por min y por mol de enzima.

La preparación de Fd-GOGAT, purificada y concentrada por ultrafiltración, se sometió a electroforesis analítica en gel de poliacrilamida, y la Fig. 31 muestra una fotografía del gel teñido para proteína, así como su correspondiente densitograma, pudiendo apreciarse una única banda por lo que puede afirmarse que la preparación obtenida es electroforéticamente homogénea.

### III.G.2. *Estudios catalíticos y cinéticos*

#### III.G.2.1. Donadores de electrones y especificidad por los sustratos

La Tabla XVIII muestra que la Fd-GOGAT purificada puede usar indistintamente ferredoxina o metil viológeno, químicamente reducidos con ditionito, como donador de electrones para la síntesis de glutamato. Sin embargo, NAD(P)H, bencil viológeno o flavinas no sirven como fuentes exógenas de poder reductor para la enzima.

Por otro lado, la Fd-GOGAT purificada de *Chlamydomonas* es altamente específica para glutamina y 2-oxoglutarato como donador y aceptor respectivamente del grupo  $-\text{NH}_2$ . Así, la reacción no tenía lugar en presencia de asparraguina o amonio, como sustitutos de la glutamina, ni con oxaloacetato en lugar de 2-oxoglutarato.

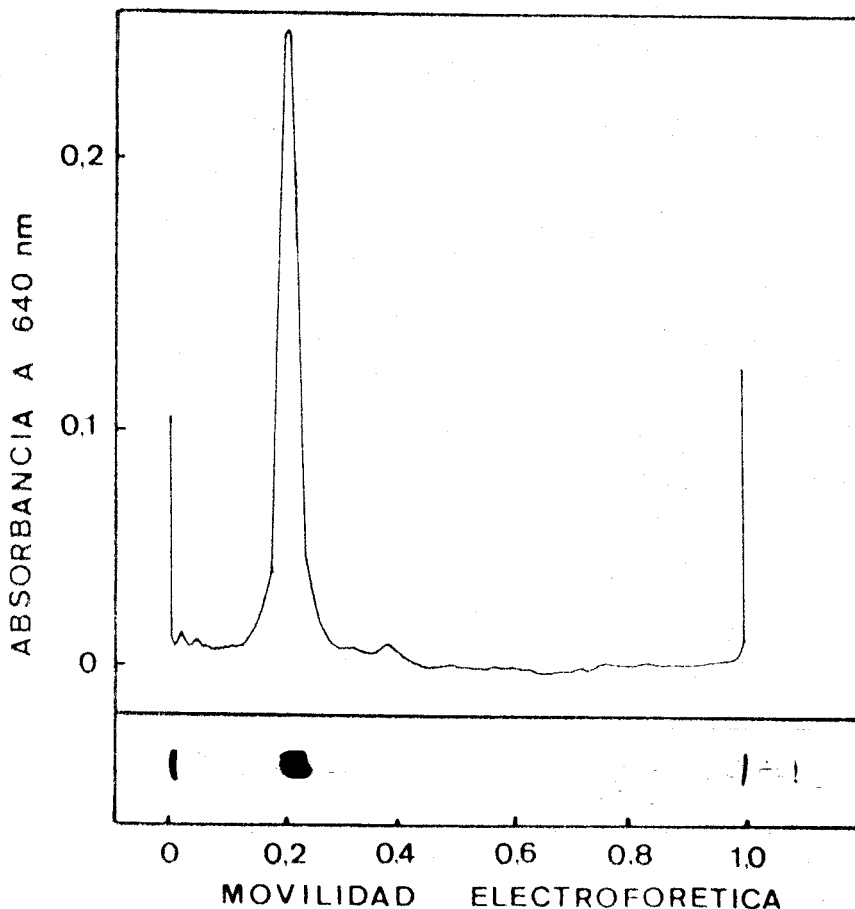


Figura 31. *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de la Fd-glutamato sintasa purificada.*

Una muestra de 20  $\mu\text{g}$  de proteína, se sometió a electroforesis analítica en un gel de poliacrilamida al 6,5 % de acrilamida. Se tiñó el gel para proteína, y el resultado es el que se observa en la parte inferior de la figura. La parte superior presenta el correspondiente densitograma. Los detalles del proceso electroforético se describen en Materiales y Métodos.

TABLA XVIII

DONADORES DE ELECTRONES DE LA  
Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C. reinhardtii*

Sistema donador de electrones	Concentraciones (mM)	Actividad (U·mg <sup>-1</sup> )
Ninguno	-	0
NADH	1,5	0
NADPH	1,5	0
Ditionito	12	0
" + Fd	" + 10 <sup>-2</sup>	11,6
" + Metil viológeno	" + 10	10,3
" + Fd + Metil viológeno	" + 10 <sup>-2</sup> + 10	14,2
" + Bencil viológeno	" + 10	2,3
" + FAD	" + 1	0
" + FMN	" + 1	0

La mezcla de reacción incluía, en un volumen final de 2 ml, 200  $\mu$ mol de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 10  $\mu$ mol de L-glutamina; 10  $\mu$ mol de 2-oxoglutarato sódico; 10  $\mu$ g de enzima purificada, y los distintos donadores de electrones, a las concentraciones indicadas. Después de 20 min a 30 °C, se paró la reacción y se determinó el glutamato formado.

### III.G.2.2. pH óptimo

La Fig. 32 pone de manifiesto la dependencia de la actividad Fd-GOGAT respecto al pH, en un intervalo comprendido entre 3,5 y 10. El pH óptimo de trabajo resultó ser 7,5, en tampón fosfato.

### III.G.2.3. Temperatura óptima

La actividad Fd-GOGAT se ensayó a distintas temperaturas, comprendidas entre 15 y 55 °C. Se observó un marcado aumento de actividad con la temperatura, alcanzándose el máximo a 35 °C. A partir de este valor, la actividad disminuía, lo que probablemente era debido a la desnaturalización térmica de la proteína (Fig. 33).

En el recuadro interno de la Fig. 33 se muestra la representación de Arrhenius de las velocidades máximas de reacción en función de la temperatura. Se observa que los valores obtenidos obedecen, en el intervalo de 15 a 35 °C, a la ecuación lineal de Arrhenius, detallada en el apartado III.E.2.5, de la cual se calculó una energía de activación igual a 84,0 kJ · mol<sup>-1</sup>, para la reacción catalizada por la Fd-GOGAT.

El valor de  $Q_{10}$ , entre 25 y 35 °C, de esta enzima es de 5,51.

### III.G.2.4. Valores de $K_m$ para los diferentes sustratos

Se realizaron una serie de representaciones de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reacción, frente a concentraciones variables de los distintos sustratos, con el objeto de estudiar la afinidad de la Fd-GOGAT por los mismos.

Los valores de  $K_m$  obtenidos se resumen en la Tabla XIX.



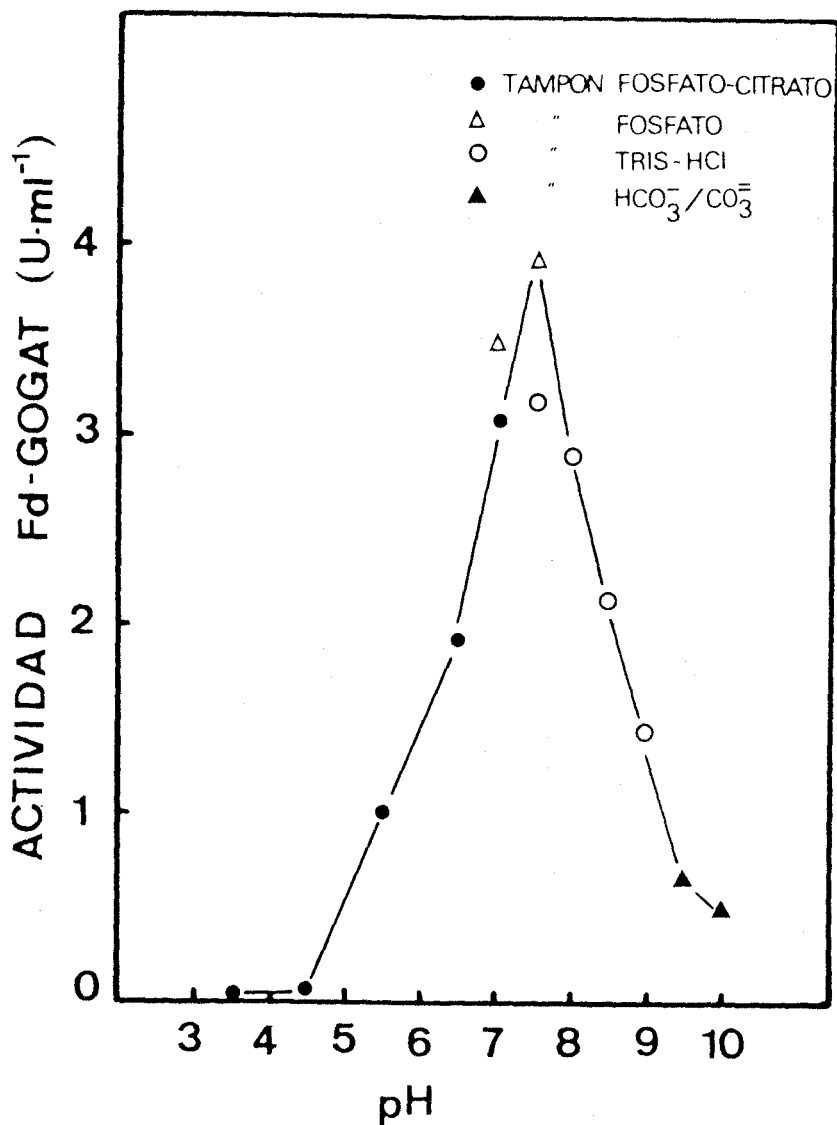


Figura 32. pH óptimo de la Fd-glutamato sintasa de *C. reinhardtii*.

La actividad Fd-GOGAT se ensayó según el procedimiento estándar que se indica en Materiales y Métodos, excepto que en cada caso se utilizaron los tampones indicados, a una concentración final de 100 mM.

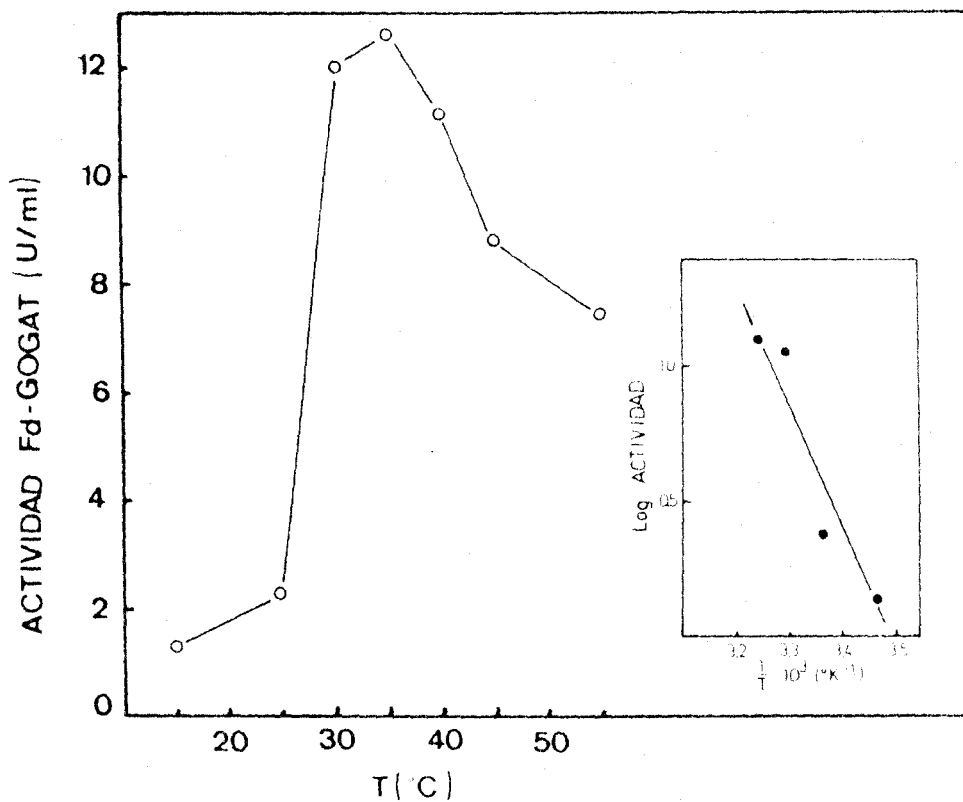


Figura 33. Temperatura óptima de la Fd-glutamato sintasa de *C.reinhardtii*.

La actividad Fd-GOGAT se ensayó a las temperaturas indicadas según se describe en Materiales y Métodos, y los valores obtenidos se recogen en la gráfica. En el recuadro interno se representa el logaritmo de la actividad frente al inverso de la temperatura (representación de Arrhenius), para el cálculo de la energía de activación.

TABLA XIX

VALORES DE  $K_m$  PARA LOS SUSTRATOS DE LA  
Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardii*

Sustrato	$K_m$ (mM)
Ferredoxina	0,015
Glutamina	0,7
2-oxoglutarato	1,0
Metil viológeno	4,7

La actividad enzimática se ensayó según se indica en Materiales y Métodos, excepto que el sustrato cuya  $K_m$  se trataba de medir se añadía a concentraciones no saturantes. Se representaron los datos de velocidad de la reacción obtenidos, frente a la concentración de sustrato utilizada en cada caso, según el modelo de dobles recíprocos de Linewaver-Burk, determinándose así el valor de las  $K_m$  correspondientes.

### III.G.2.5. Inhibición de la actividad

La Tabla XX recoge el efecto de varios compuestos inhibidores sobre la Fd-GOGAT purificada. Como puede observarse, la enzima es altamente sensible a la inhibición por azaserina y DON. La azaserina ejerce su efecto inhibitor tanto cuando se añade a la proteína oxidada como a la reducida, sugiriendo que la inhibición es independiente del estado redox de la proteína. Por otra parte, dado que la enzima persiste inhibida tras someterla, después del tratamiento con azaserina, a una diálisis prolongada, es presumible que la azaserina se une a la Fd-GOGAT de forma covalente, por lo que la inhibición resulta irreversible. La adición en anaerobiosis de los sustratos a la enzima tratada con azaserina, consigue recuperar tan sólo un 13 % de la actividad inicial después de 45 h de incubación a 0 °C.

El pHMB, a una concentración superior a 1 µM, comienza a inhibir a la enzima, siendo la inhibición prácticamente total para concentraciones superiores a 50 µM.

El verde de bromocresol y ácido flaviánico inhiben parcialmente y en distinta proporción la actividad de la Fd-GOGAT.

La albizziina, el aminoxiacetato y el MSX no ejercen inhibición significativa sobre la Fd-GOGAT, al igual que ocurre con el cianuro y cianato.

Por otra parte, la actividad Fd-GOGAT es muy resistente a la inactivación térmica, de forma que se requiere un calentamiento prolongado a 60 °C para anular completamente la actividad (Fig. 34).

TABLA XX

INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD  
Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardii*

Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad (%)
Ninguno	-	100
Azaserina	0,5	0
6-diazo-5-oxo-L-norleucina	5	0
Albizziina	5	89
L-metionina-DL-sulfoximina	5	104
Aminooxiacetato	5	116
Verde de bromocresol	1	11
Acido flaviánico	1	49
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	0,001	100
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	0,05	6
Cianuro	1	100
Cianato	1	103

La actividad enzimática se determinó según se indica en Materiales y Métodos, en mezclas de reacción que contenían 200  $\mu\text{mol}$  de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 10  $\mu\text{mol}$  de L-glutamina; 10  $\mu\text{mol}$  de 2-oxoglutarato sódico; 37  $\mu\text{g}$  de enzima purificada (en el tampón estándar carente de DTE), y la concentración indicada del correspondiente inhibidor.

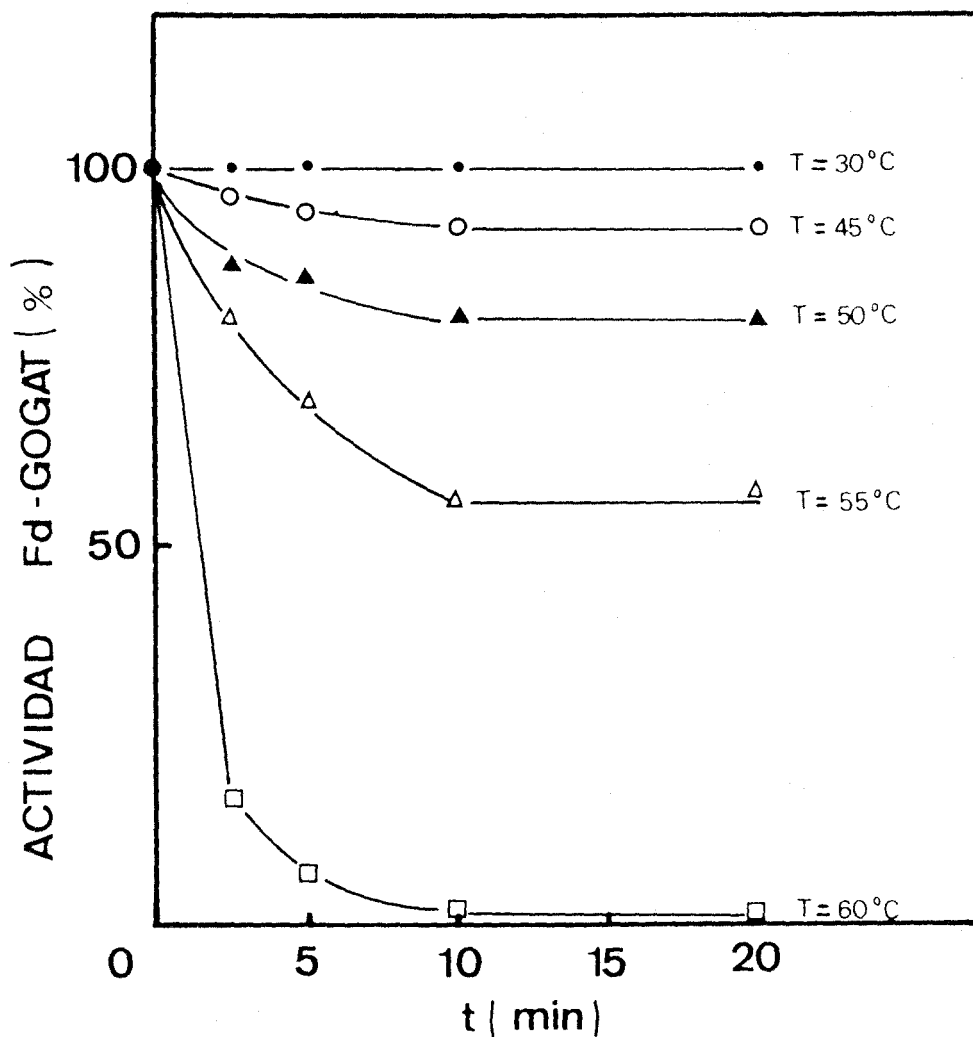


Figura 34. Inactivación térmica de la Fd-glutamato sintasa de *C.reinhardtii*.

Preparaciones de enzima purificada se incubaron durante los tiempos indicados, a cada una de las temperaturas que se muestran, determinándose la actividad por adición de alícuotas de la preparación enzimática correspondiente a los reactivos del ensayo estándar.

### III.G.2.6. Efecto de los sustratos sobre la actividad

La Tabla XXI pone de manifiesto que la Fd-GOGAT es sensible a inhibición por sustrato, debida a un exceso de 2-oxo glutarato, pero no de glutamina.

### III.G.3. *Determinación de parámetros fisicoquímicos*

#### III.G.3.1. Radio de Stokes

El radio de Stokes de la Fd-GOGAT se determinó por filtración a través de una columna de Bio-Gel A-1.5 m, según se describe en Materiales y Métodos (apartado II.F.3), siendo los resultados obtenidos los que se representan en la Fig. 35, pudiéndose calcular a partir de ellos un valor para el mencionado parámetro de 4,1 nm.

#### III.G.3.2. Coeficiente de sedimentación

El coeficiente de sedimentación de esta enzima se determinó por centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa, según se especifica en el apartado II.F.2. Los resultados obtenidos después de la centrifugación, representados en la Fig. 36, permiten calcular para la Fd-GOGAT, un coeficiente de 8,3 S. Aunque no se muestra en dicha figura, también se determinó la absorción a 280 nm de las fracciones obtenidas en el gradiente, observándose un único pico de proteína coincidente con el de actividad Fd-GOGAT, lo que confirma la homogeneidad de la preparación.

#### III.G.3.3. Peso molecular de la proteína nativa

El peso molecular de la Fd-GOGAT nativa se determinó por dos técnicas diferentes:

TABLA XXI

INHIBICION POR EXCESO DE 2-OXOGLUTARATO  
Y GLUTAMINA DE LA Fd-GLUTAMATO SINTASA  
DE *C.reinhardii*

Sistema de ensayo	Actividad Fd-GOGAT
	(%)
Estándar	100
+ glutamina	92
+ 2-oxoglutarato	35

Se ensayó la actividad Fd-GOGAT en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, y en presencia de un exceso de glutamina ó 2-oxoglutarato (100 mM en cada caso). El 100 % de actividad corresponde a 14 U por ml.



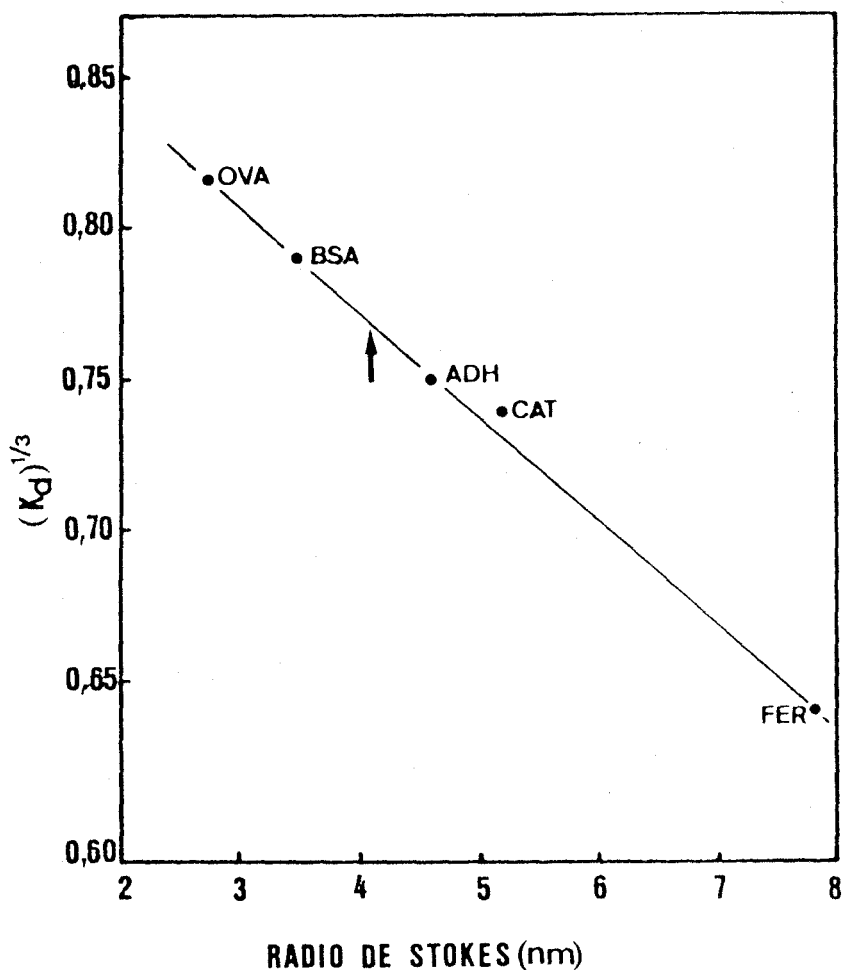


Figura 35. *Determinación del radio de Stokes de la Fd-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Las proteínas de radios de Stokes conocidos, usadas como patrones, fueron: ovoalbúmina de gallina (OVA, 2,75 nm), seroalbúmina bovina (BSA, 3,50 nm), alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH, 4,6 nm), catalasa bovina (CAT, 5,20 nm) y ferritina de bazo de caballo (FER, 7,80 nm). La flecha indica la localización de la Fd-GOGAT. Los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos.

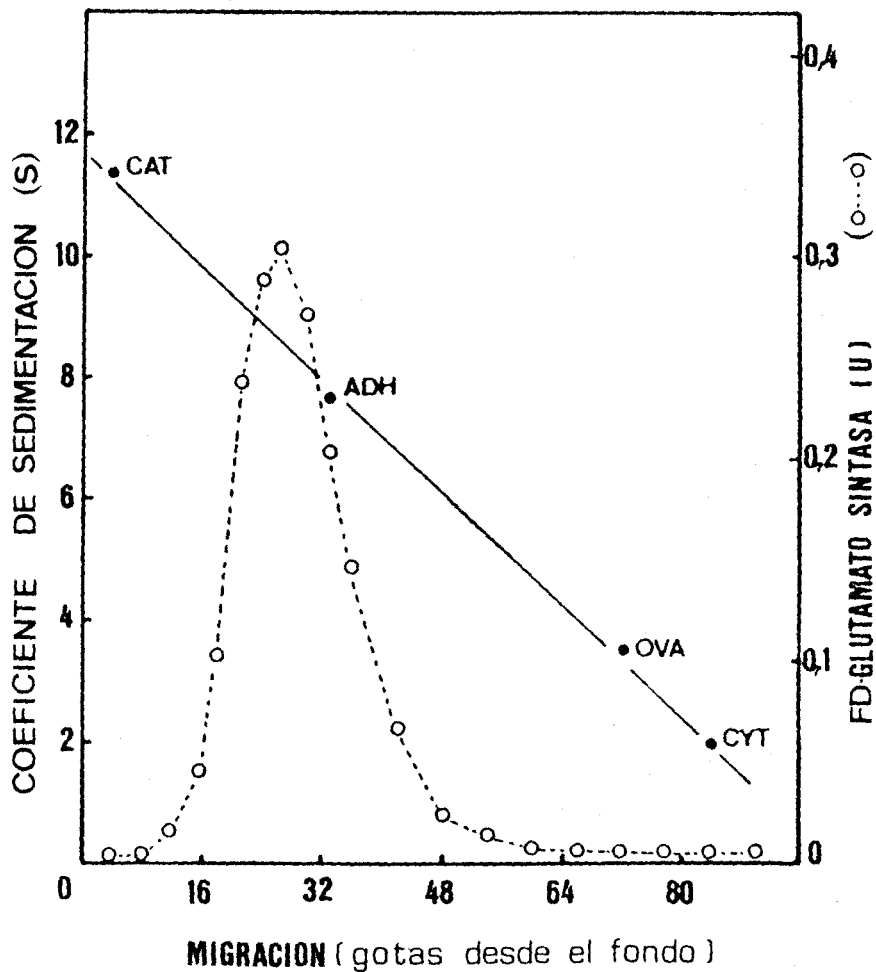


Figura 36. *Determinación del coeficiente de sedimentación de la Fd-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Los patrones para la determinación del coeficiente de sedimentación fueron: catalasa bovina (CAT; 11,3 S), alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH, 7,6 S), ovoalbúmina de gallina (OVA, 3,5 S) y citocromo *c* de corazón de caballo (CYT, 1,8 S). Se muestra la distribución de la actividad a lo largo del gradiente de densidad de sacarosa. Los procedimientos concretos se indican en Materiales y Métodos.

- a) A partir del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación, haciendo uso de la fórmula de Siegel y Monty, ya detallada en el apartado III.E.3.3, lo que arrojó un valor de 144.000.
- b) Mediante electroforesis en geles de diferente concentración de acrilamida, siguiendo el método de Hedrick y Smith (1968), por el cual la representación del logaritmo de la movilidad electroforética relativa de las proteínas frente a la concentración de acrilamida del gel, da lugar a una serie de líneas no paralelas, cuyas pendientes están directamente relacionadas con el peso molecular. La Fig. 37 muestra las diferentes movilidades electroforéticas de la Fd-GOGAT y las proteínas patrones en electroforesis al 3,50 %, 5 %, 6,25 % y 7,50 % de acrilamida. La representación que recoge la Fig. 38 de los datos anteriores, permite calcular un peso molecular para la Fd-GOGAT de 144.000 .

#### III.G.3.4. Peso molecular de la Fd-GOGAT en condiciones desnaturalizantes con SDS y estimación del número de subunidades

Una preparación homogénea de Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y mercaptoetanol, condiciones desnaturalizantes que provocan la disociación de las subunidades en una proteína oligomérica. El gel teñido para proteína, así como su densitograma, se muestran en la Fig. 39.

La presencia en el gel de una sola banda de proteína confirma la homogeneidad de la preparación enzimática, anteriormente establecida (apartado III.G.1), a la vez que pone de manifiesto la contribución a la estructura de la enzima de un único tipo de cadena polipeptídica.

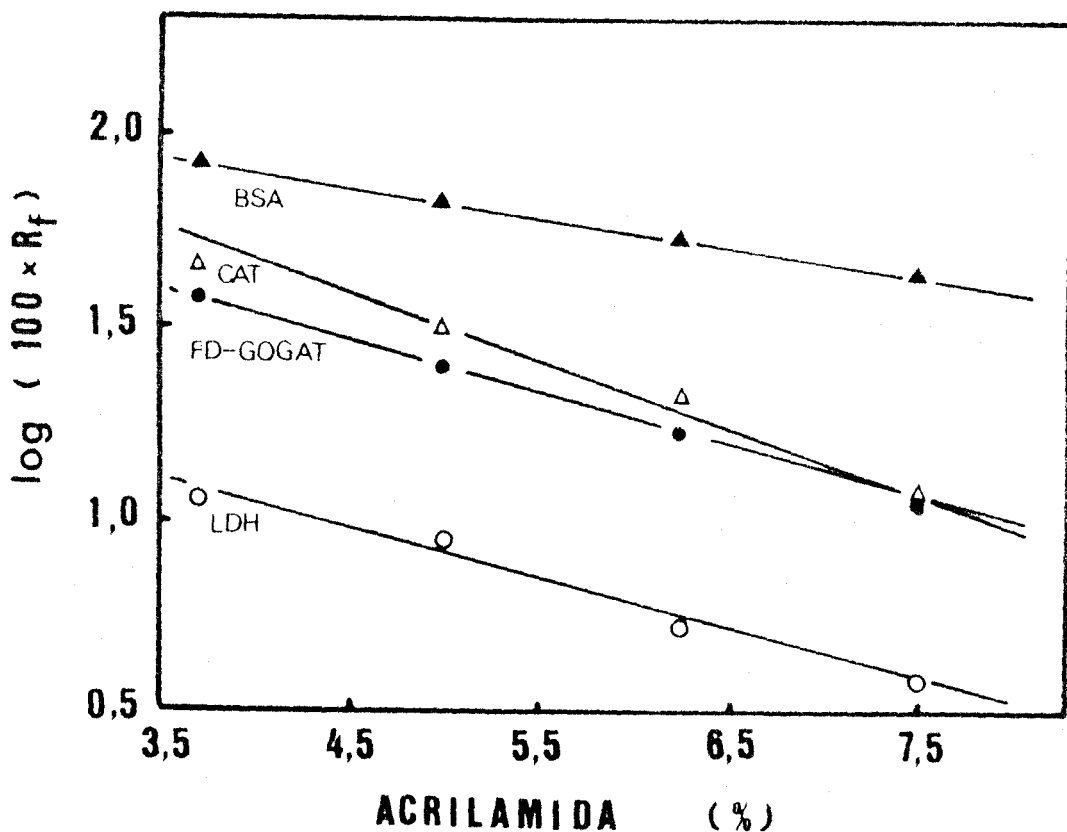


Figura 37. Electroforesis en geles de poliacrilamida, con diferente concentración de acrilamida, de la Fd-glutamato sintasa y de proteínas patrones.

20  $\mu\text{g}$  de Fd-GOGAT o de las diferentes proteínas patrones, se sometieron a electroforesis en geles con las concentraciones de acrilamida que se indican. Concluida la electroforesis, se tiñeron los geles (según se indica en Materiales y Métodos), y se calcularon los valores de movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ) para las distintas proteínas. BSA = seroalbúmina bovina; LDH = láctico deshidrogenasa de músculo de conejo; CAT = catalasa bovina.

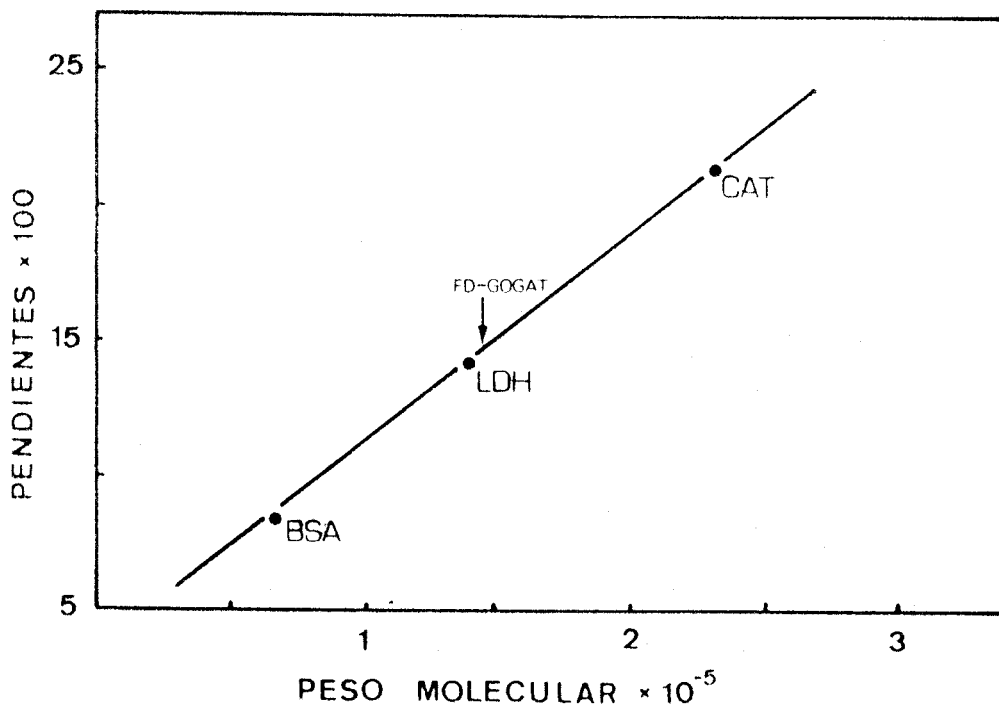


Figura 38. *Determinación del peso molecular de la Ed-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Las pendientes de las rectas obtenidas en la figura anterior, se representan aquí frente a los correspondientes pesos moleculares (BSA, 67.000; CAT, 232.000; LDH, 140.000).

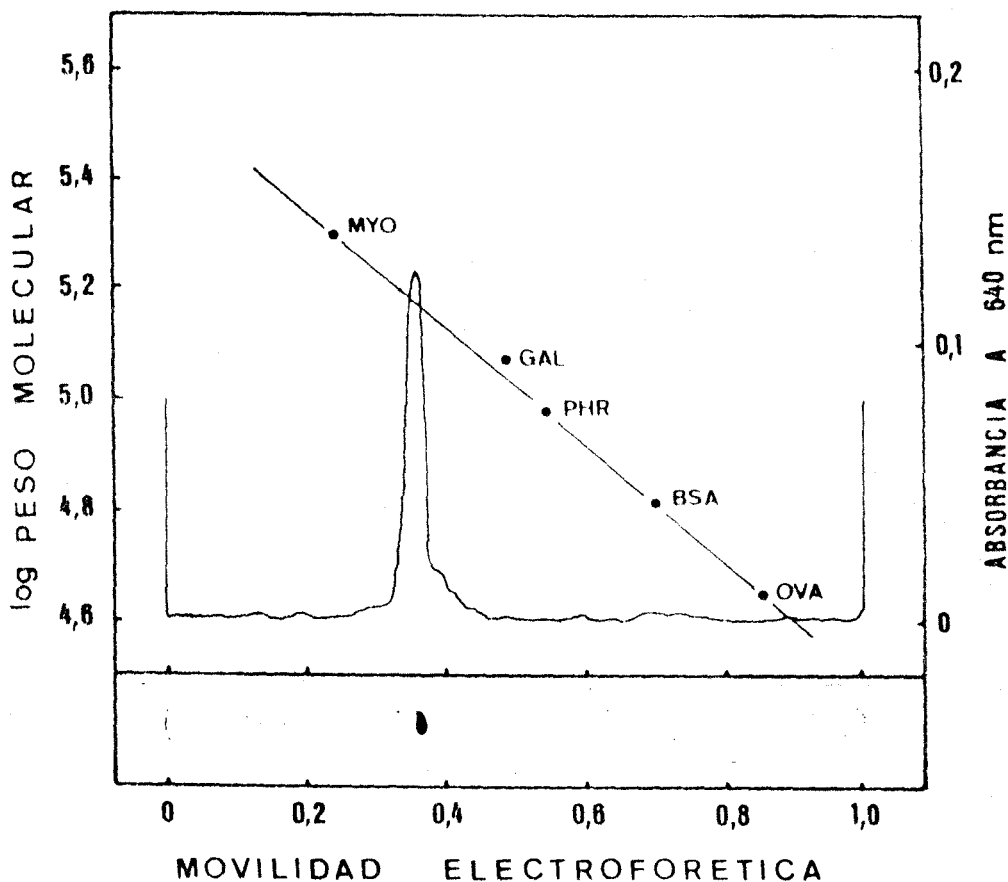


Figura 39. *Determinación del peso molecular de la Fd-glutamato sintasa de C.reinhardtii por electroforesis en SDS.*

Se procesaron muestras de 20  $\mu$ g de proteína, bajo condiciones desnaturalizantes con SDS, en geles al 5 % de acrilamida, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En la figura, se muestra el gel correspondiente a la Fd-GOGAT (teñido para proteína), y su densitograma a 640 nm. Las proteínas patrones usadas, y sus pesos moleculares, eran: ovoalbúmina (OVA, 45.000); seroalbúmina bovina (BSA, 66.200); fosforilasa *b* (PHR, 92.500);  $\beta$ -galactosidasa (GAL, 116.250), y miosina (MYO, 200.000).

A fin de calcular el peso molecular de la Fd-GOGAT, se sometieron simultáneamente a electroforesis, en las mismas condiciones, la enzima y varias proteínas marcadoras con cadenas polipeptídicas de pesos moleculares conocidos. En la Fig. 39 se muestra también el resultado obtenido al representar la movilidad electroforética de las distintas proteínas frente al peso molecular. Por esta técnica se calculó un peso molecular para el polipéptido que forma la Fd-GOGAT de 151.000.

Comparando el valor de peso molecular así obtenido, con los establecidos para la proteína nativa (apartado anterior), se concluye definitivamente que la Fd-GOGAT está compuesta por una única cadena polipeptídica, cuyo peso molecular medio es de 146.000. En base a dicho valor se han hecho los cálculos moleculares de la enzima.

#### III.G.3.5. Coeficiente de fricción

Este parámetro se calculó mediante la fórmula detallada en el apartado III.E.3.4, asumiendo un peso molecular de 146.000. El valor calculado es 1,19, indicativo de una forma molecular relativamente esférica.

#### III.G.4. *Identificación de grupos prostéticos*

##### III.G.4.1. Espectros de absorción de la Fd-GOGAT nativa en su estado oxidado y reducido

La Fig. 40, A, muestra el espectro de absorción de la Fd-GOGAT de *C.reinhardii* en su estado nativo. La proteína presenta máximos de absorción a 278; 377 y 437 nm, con coeficientes de extinción respectivos de 187; 22 y 25  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . También tiene hombros a 415 y 460 nm.

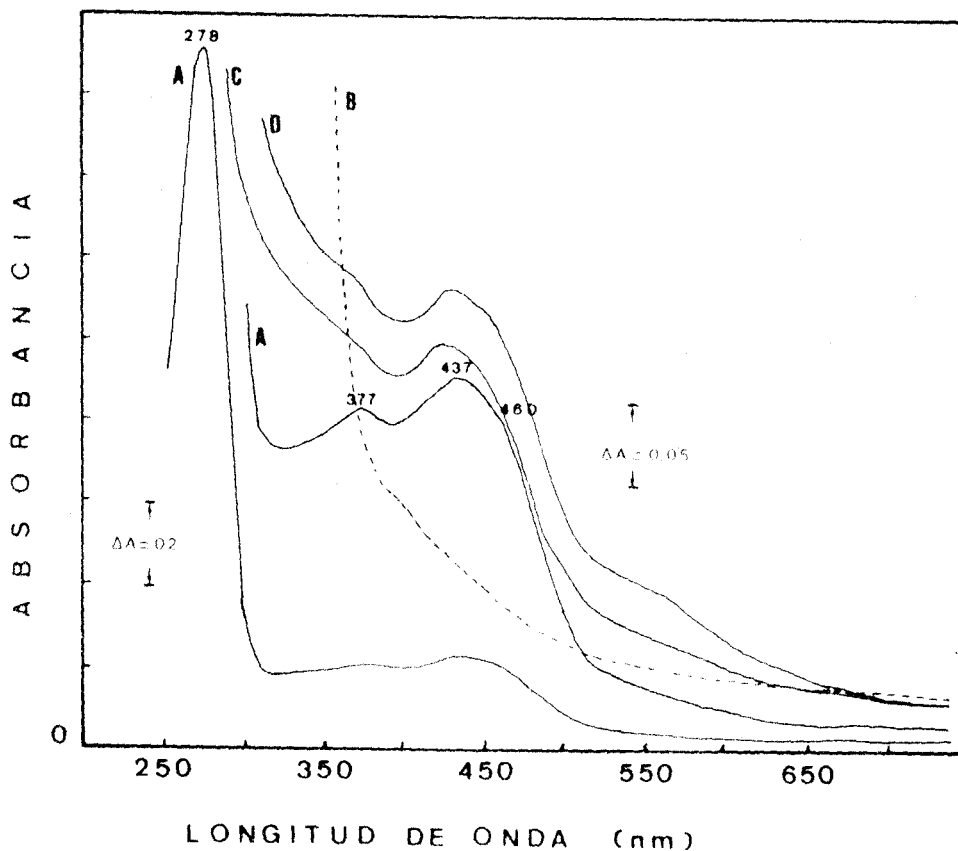


Figura 40. *Espectros de absorción de la Fe-glutamato sintasa de C.reinhardtii.*

Espectros de la enzima (1,37 mg de proteína por ml) en tampón estándar. *A*, enzima nativa. *B*, enzima reducida por la adición de ditionito sódico. *C*, *B* después de añadir unos cristales de 2-oxoglutarato sódico; *D*, *C* más glutamina.



La reducción de la enzima con ditionito sódico provoca la pérdida del pico a 437 nm (Fig. 40, B).

La adición de 2-oxoglutarato, sustrato fisiológico, a la Fd-GOGAT reducida restaura rápidamente las propiedades espectrales de la enzima nativa (Fig. 40, C), mientras que la glutamina, por sí sola, es incapaz de reoxidar a la enzima, aunque en su presencia aparece un ligero hombro a 570 nm (Fig. 40, D).

#### III.G.4.2. Espectro de absorción del componente flavínico de la Fd-GOGAT

Al hervir una preparación de enzima durante 3 min, la desnaturalización térmica provocó la liberación de un componente de color amarillo, cuyo espectro de absorción se muestra en la Fig. 41, con máximos a 266; 355 y 447 nm, característicos de los flavín nucleótidos.

#### III.G.4.3. Espectros de emisión de fluorescencia de la Fd-GOGAT nativa y de su componente flavínico

Cuando se excita con luz de 450 nm el componente liberado por la desnaturalización térmica de la enzima, se registra una emisión de fluorescencia, con un máximo a 530 nm, característica de flavina, que no tiene lugar en la enzima nativa u holoenzima (Fig. 42).

#### III.G.4.4. Análisis cuantitativo del componente flavínico

La Tabla XXII muestra la composición establecida, por los análisis fluorimétricos y fotométricos detallados en Materiales y Métodos (apartado II.C.6.1), de flavinas en la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*. En la enzima coexisten el flavín adenín dinucleótido (FAD) y el flavín mononucleótido (FMN) en proporciones equimoleculares, a razón, presumiblemente, de 1 mol de cada uno por mol de proteína.

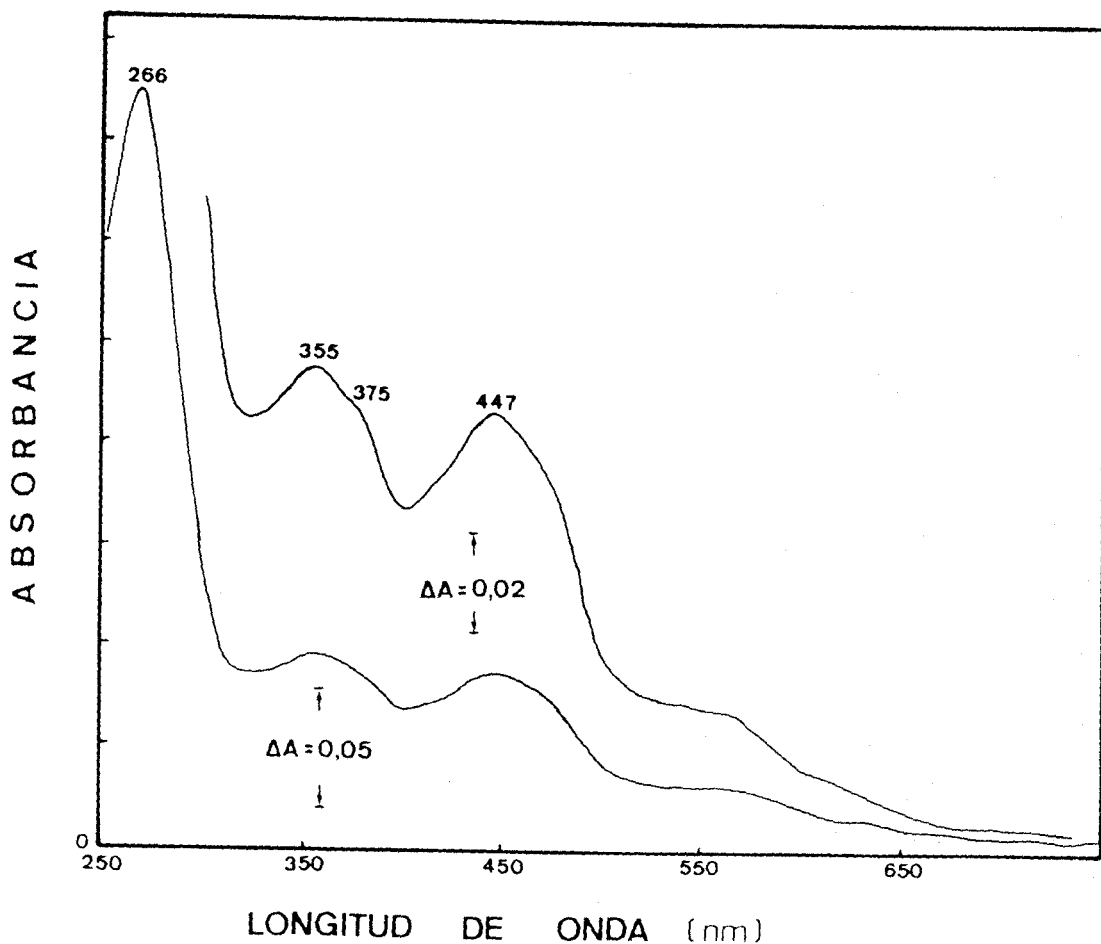


Figura 41. Espectro de absorción del grupo flavínico de la Fd-glutamato sintasa de *C. reinhardtii*.

Una preparación 4  $\mu\text{M}$  de Fd-GOGAT pura, en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,7, suplementado con EDTA 0,1 mM, se hirvió durante 3 min en un tubo de centrifuga protegido de la luz con papel de aluminio. Se centrifugó a 27.000  $\times g$  durante 15 min, y al sobrenadante obtenido se le determinó el espectro de absorción frente a un blanco con tampón.

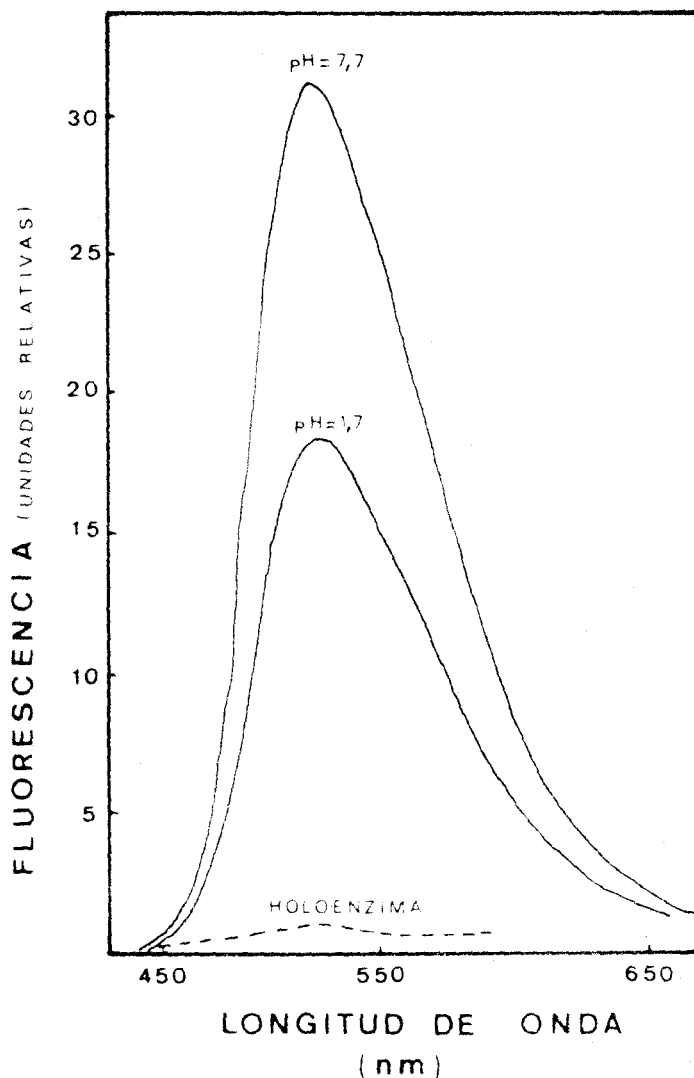


Figura 42. Espectros de emisión de fluorescencia de la Fd-glutamato sintasa de *C.reinhardtii* y de su componente flavínico.

El componente flavínico liberado por desnaturación térmica a partir de 2 nmol de Fd-GOGAT, se diluyó hasta 2,5 ml con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,7, suplementado con EDTA 0,1 mM, y se registró el espectro de emisión de fluorescencia al excitar con luz de 450 nm. El espectro, a pH 1,7, se obtuvo después de añadir a la disolución anterior 0,2 ml de HCl 1 N. Con línea de trazos se muestra el espectro de fluorescencia, a pH 7,7, de la enzima nativa u holoenzima, diluida de la misma forma.

TABLA XXII

COMPOSICION DE FLAVINAS DE LA  
Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C. reinhardtii*

	Valores experimentales						Valores deducidos
	(moles por mol de enzima)						
	<i>I</i>		<i>II</i>		<i>III</i>		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	
Flavina total	1,5	0,9	0,7	0,7	1,4	1,3	2
FAD	-	0,5	-	0,5	-	0,8	1
FMN	-	0,4	-	0,2	-	0,5	1

Tres preparaciones distintas de Fd-GOGAT purificada, conteniendo cada una de 0,3 a 0,4 mg de proteína, se utilizaron para cuantificar el contenido flavínico de la Fd-GOGAT. En las preparaciones *I* y *II*, el componente flavínico se liberó por desnaturalización térmica, mientras que en la *III*, se hizo por precipitación con ácido tricloroacético.

*a.* Medida fotométrica, utilizando los coeficientes de extinción medios a 445-450 nm y 373-375 nm de FAD FMN (Koziol, 1971).

*b.* Medida fluorimétrica por el método de Faeder y Siegel (1973).

*c.* Medida fluorimétrica por el método de Koziol (1971).

Detalles sobre los métodos utilizados se recogen en Materiales y Métodos.

#### III.G.4.5. Espectro de absorción de la deflavoenzima

Se registró el espectro de absorción diferencial de la holoenzima Fd-GOGAT frente al componente flavínico liberado por desnaturalización térmica, tal y como se recoge en la Fig. 43. Este espectro muestra máximos de absorción a 278; 400 y 470 nm, y hombros a 317 y 495 nm.

#### III.G.4.6. Determinación analítica de hierro y sulfuro lábil

La determinación colorimétrica de hierro y sulfuro lábil, en preparaciones purificadas de Fd-GOGAT, proporcionó los valores que se muestran en la Tabla XXIII, indicativos de la presencia de 3 átomos de hierro y 4 átomos de azufre inorgánico lábil por molécula de Fd-GOGAT.

#### III.G.4.7. Espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR)

La Fig. 44 muestra el espectro de EPR, registrado a 4 °K de la Fd-GOGAT en su estado nativo, en el que se observa una señal, aparentemente isotrópica, a un valor de  $g = 2,03$ . Dicho espectro no varía significativamente al tratar la proteína con los sustratos fisiológicos, 2-oxo glutarato y glutamina, o bien con ferricianuro.

Por otra parte, resulta importante destacar que esta señal de EPR es muy sensible a la temperatura, ya que desaparece cuando el espectro se registra por encima de 6 °K.

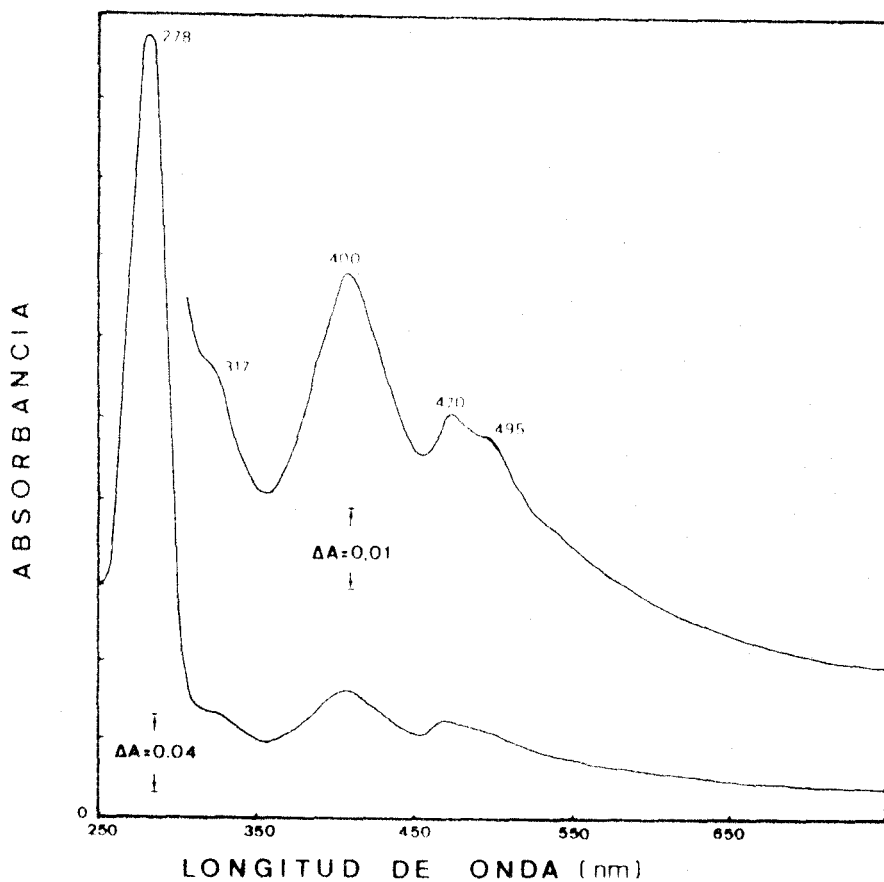


Figura 43. Espectro de absorción de la Fd-glutamato sintasa de *C. reinhardtii* desprovista de flavina.

Se registró el espectro diferencial de la enzima nativa *minus* el grupo flavínico obtenido según se indica en la Fig. 41.

TABLA XXIII

ANALISIS DE HIERRO Y SULFURO LABIL  
DE LA Fd-GLUTAMATO SINTASA DE *C.reinhardii*

	Valores experimentales		Media	Valores deducidos
	<i>I</i>	<i>II</i>		
Hierro	2,0	3,0	2,5	3
Sulfuro lábil	4,3	3,3	3,8	4

Se determinó colorimétricamente el contenido en hierro y sulfuro inorgánico lábil de dos preparaciones distintas (*I* y *II*) de Fd-GOGAT, utilizando 1 mg de proteína para los análisis de hierro, y 0,5 a 0,7 mg para el análisis de azufre, siguiendo los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.

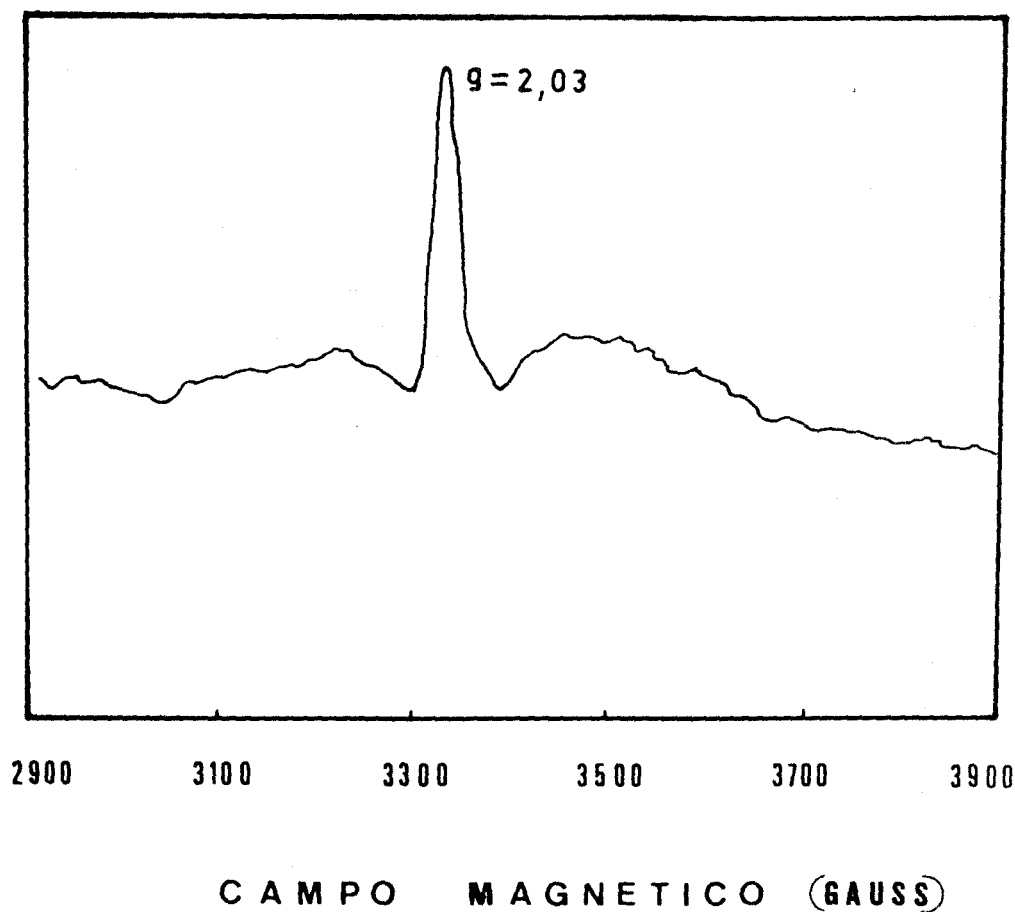


Figura 44. *Espectro de EPR de la Fd-glutamato sintasa de C. reinhardtii.*

Se utilizó una preparación de Fd-GOGAT nativa 82  $\mu\text{M}$  en tampón estándar. El espectro de EPR se registró en las siguientes condiciones instrumentales: frecuencia de microondas 9,4 GHz; intensidad de microondas 20 dB; amplitud de modulación 32 G; ganancia  $3,2 \cdot 10^4$ ; temperatura 4  $\text{°K}$ .



Cuando se recoge el espectro de EPR de la proteína nativa para un intervalo de campo magnético mayor aparecen, además de la señal mencionada, señales a un valor medio de  $g = 4,44$ , correspondientes a hierro inespecífico asociado al tampón (Fig. 45, A).

La reducción de la Fd-GOGAT con ditionito solo, o en la presencia de ferredoxina o metil viológeno, provoca la desaparición de la señal observada en la enzima nativa, no apareciendo, por el contrario, ninguna otra señal que pudiera atribuirse a una agrupación sulfoférica típica,  $\{2\text{Fe}-2\text{S}\}$  ó  $\{4\text{Fe}-4\text{S}\}$  reducida (Fig. 45, B y C).

### III.G.5. Información acerca del mecanismo de la reacción

La Fig. 46 muestra que cuando una preparación de Fd-GOGAT se encuentra en presencia de ferredoxina reducida químicamente con ditionito, y se le añade un exceso de 2-oxoglutarato, la señal debida a la ferredoxina desaparece, lo que indica que, en ausencia de glutamina, se produce una reacción redox entre la ferredoxina y el 2-oxoglutarato, catalizada por la enzima.

Por otra parte, cuando se trata una preparación purificada de Fd-GOGAT, con un exceso de ferredoxina reducida y de los sustratos, 2-oxoglutarato y glutamina, tiene lugar el recambio catalítico o "turnover" de la enzima, pudiendo observarse en el correspondiente espectro de EPR una señal isotrópica a  $g = 2,00$  y, casi superpuesta con ella, otra señal con valores de  $g$  a 2,05; 1,96 y 1,88, propia de la presencia de ferredoxina reducida en la preparación (apartado III.F.3.2) (Fig. 47, A). La Fig. 47, B, muestra la señal debida exclusivamente a la proteína, una vez sustraídas las señales que presentaba un control adecuado conteniendo sólo ferredoxina reducida. Se trata de una señal propia de un radical libre.

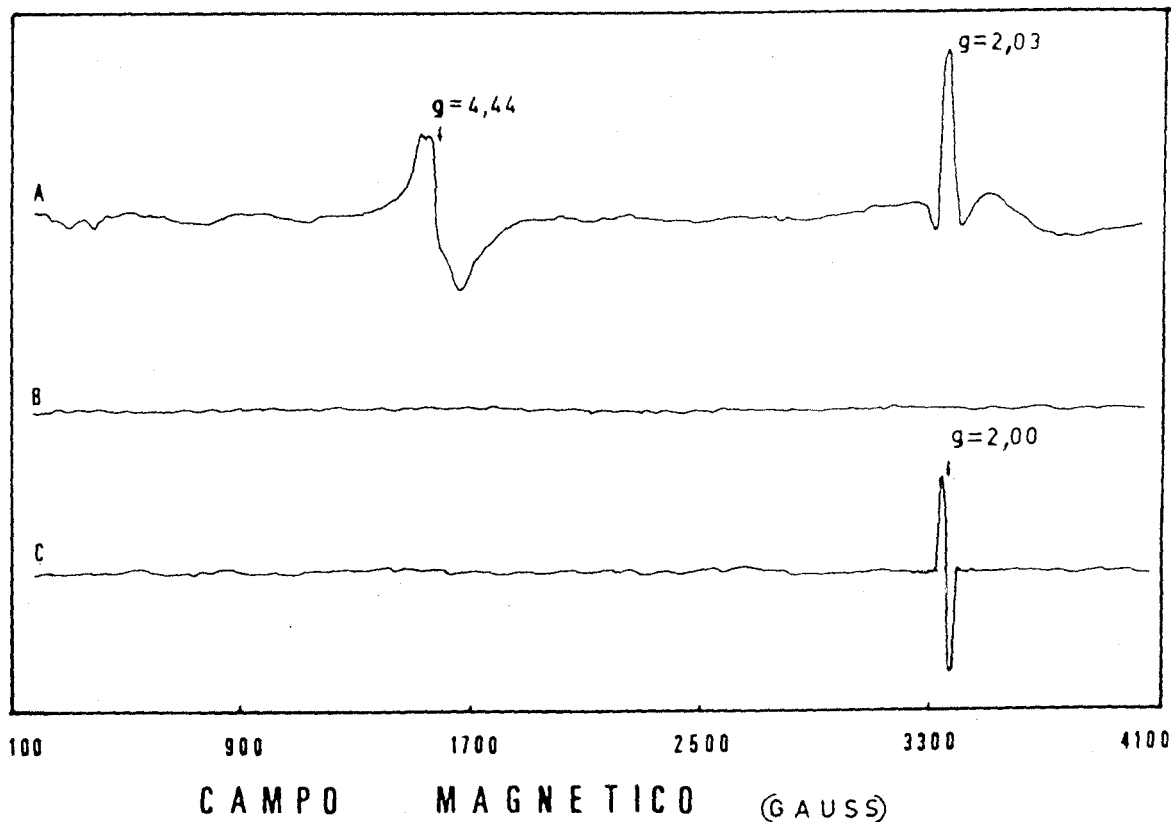


Figura 45. Espectros de EPR de la Fd-glutamato sintasa, oxidada y reducida, de *C.reinhardtii*.

Una preparación de Fd-GOGAT  $82 \mu\text{M}$ , se utilizó para registrar el espectro de EPR antes (A) y después (B) de la adición de unos cristales de ditionito bajo corriente de Argon. El espectro C corresponde a una muestra de igual concentración, reducida por la adición al 10 % (V/V) de una solución de metil viológeno 200 mM y ditionito 200 mM en Tris-HCl 100 mM, pH 9,0. Las condiciones instrumentales fueron: frecuencia de microondas 9,4 GHz; intensidad de microondas 20 dB; amplitud de modulación 10 G; ganancia  $6,4 \cdot 10^4$ ; temperatura 4,1  $\text{O}^{\circ}\text{K}$ .

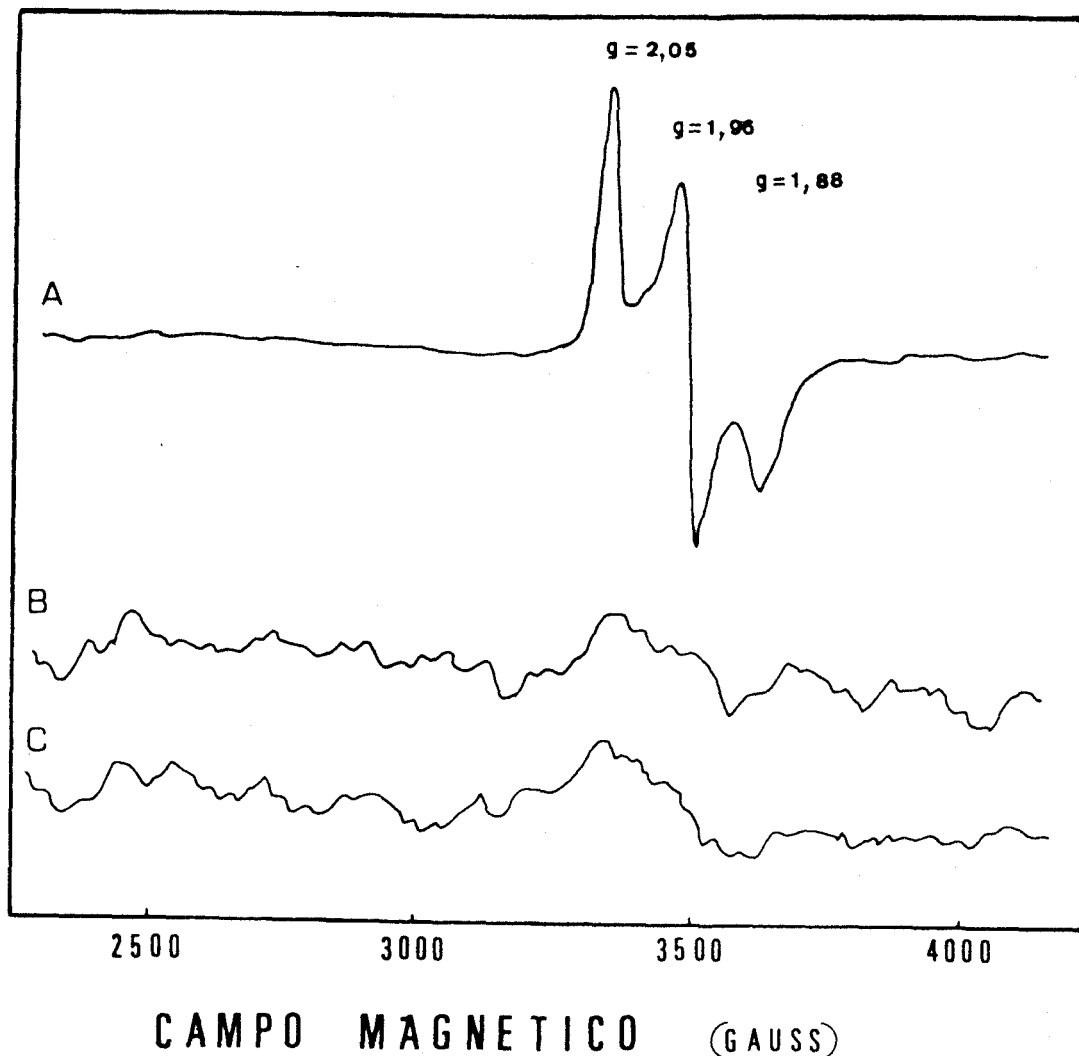


Figura 46. *Espectros de EPR de la Fd-glutamato sintasa de C.reinhardtii en presencia de ferredoxina reducida y reoxidación por 2-oxoglutarato.*

A una preparación de Fd-GOGAT 100  $\mu\text{M}$ , en tampón estándar, se añadió ferredoxina de *C.reinhardtii* hasta una concentración final de 800  $\mu\text{M}$ , y ditionito 5 mM, registrándose el espectro de EPR (A). Al mismo tubo se añadió 2-oxo glutarato 5 mM, registrándose nuevamente el espectro de EPR (B). C recoge el espectro obtenido de la misma preparación tras ser reoxidada con aire. Las condiciones experimentales fueron: frecuencia de microondas, 9,4 GHz; intensidad de microondas, 20 dB; amplitud de modulación 10 G; ganancia,  $2 \cdot 10^5$ ; temperatura 10  $\circ\text{K}$ .

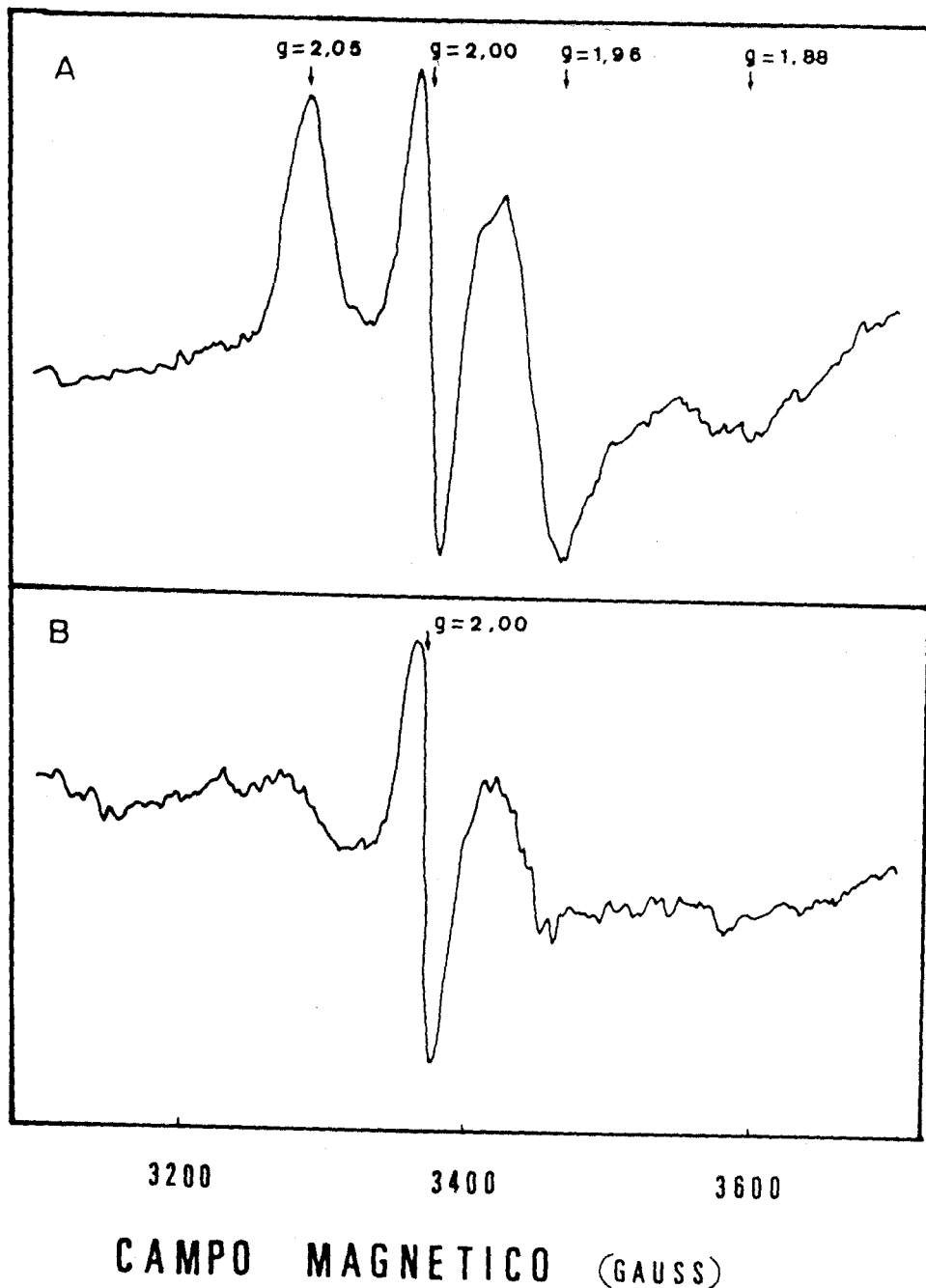


Figura 47. Espectros de EPR de la Fd-glutamato sintasa en recambio catalítico o "turnover".

Se utilizó una preparación de Fd-GOGAT  $82 \mu\text{M}$  en tampón estándar a la que se adicionó, en condiciones anaeróbicas, ferredoxina  $100 \mu\text{M}$  y unos cristales de ditionito, glutamina y 2-oxoglutarato, inmediatamente antes de ser congelada la muestra. El espectro obtenido en dichas condiciones es el A. B recoge el espectro resultante de sustraer las señales debidas a la ferredoxina reducida. Las condiciones instrumentales fueron: frecuencia de microondas,  $9,4 \text{ GHz}$ ; intensidad de microondas,  $20 \text{ dB}$ ; amplitud de modulación,  $10 \text{ G}$ ; ganancia,  $1,25 \cdot 10^5$ ; temperatura,  $7,2 \text{ }^\circ\text{K}$ .

La adición a la Fd-GOGAT, previamente reducida con ditionito, de azaserina, que inhibe irreversiblemente la actividad enzimática porque se une covalentemente a la proteína (apartado III.F.2.5), no provoca cambios importantes en el espectro de absorción de la Fd-GOGAT reducida (Fig. 48, B y C). Sin embargo, la presencia de dicho inhibidor impide que el 2-oxoglutarato reoxide a la proteína (Fig. 48, C). Por su parte, si una preparación de Fd-GOGAT, tratada según acabamos de indicar, se somete a una diálisis prolongada, presenta un espectro de absorción indicativo de que los grupos prostéticos flavínicos se han reoxidado (Fig. 48, D), con ligeras modificaciones en la absorción en torno al máximo a 377 nm. Esta preparación seguía siendo inactiva en su función catalítica.

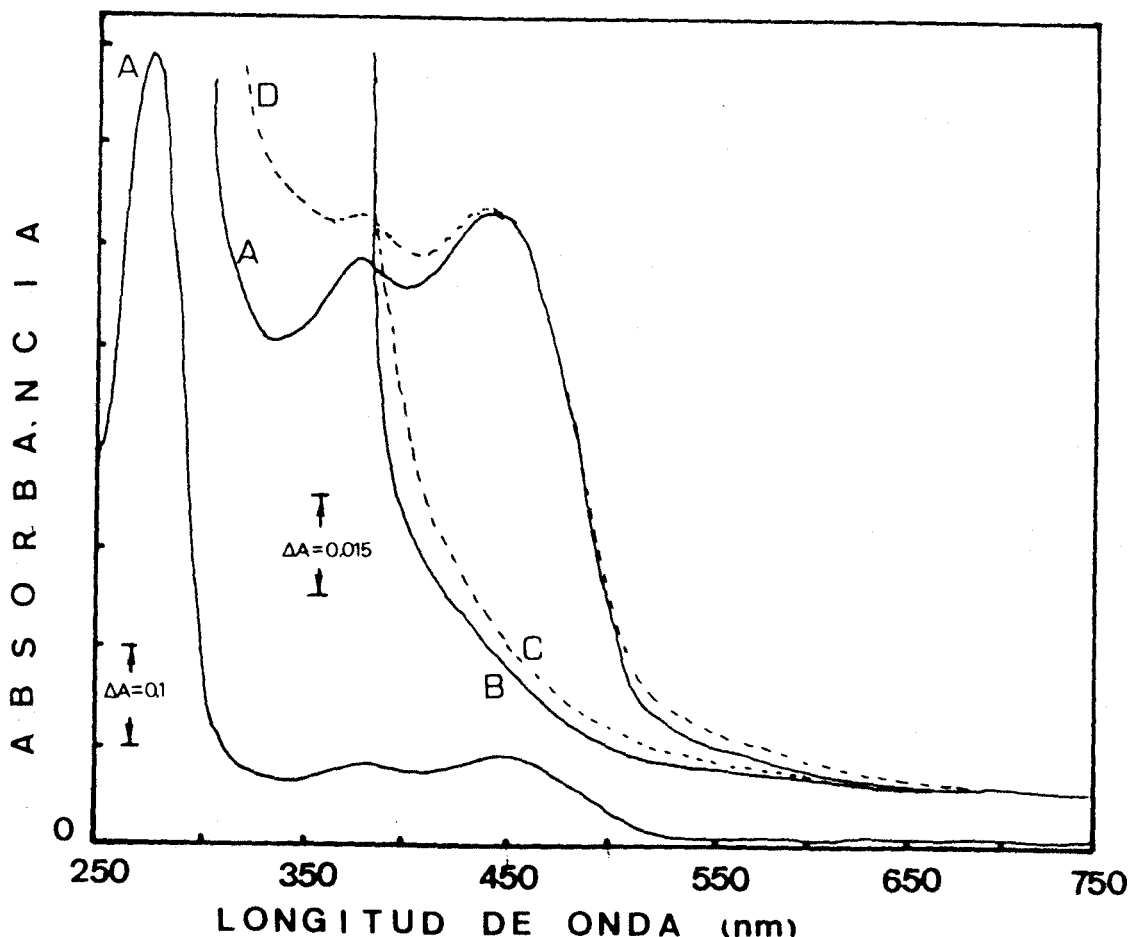


Figura 48. Efecto de la azaserina en la reoxidación por 2-oxoglutarato de la Fd-glutamato sintasa reducida de *C. reinhardtii*.

A una preparación  $3,6 \mu\text{M}$  de Fd-GOGAT en tampón estándar se le registraron los espectros de absorción en su estado nativo (A), y después de la adición a la cubeta del espectrofotómetro de unos cristallitos de ditionito sódico (B). Tras la adición posterior de unos cristales de azaserina se registró el espectro C, idéntico al que se obtenía por la subsiguiente adición de 2-oxoglutarato. Después de someter la preparación enzimática a diálisis prolongada durante 24 h frente al tampón estándar, se obtuvo el espectro D.

#### IV. DISCUSSION

Dado que *Chlamydomonas reinhardtii* carece de vacuolas, no puede acumular  $\text{NH}_4^+$  en el interior celular, por lo que la medida del consumo de este ion por su desaparición del medio de cultivo, puede utilizarse para evaluar su asimilación, que incluye los sistemas de transporte y enzimático encargados de su incorporación a esqueletos carbonados (Cullimore y Sims, 1981 b).

Básicamente, la asimilación de amonio en *C. reinhardtii* es un proceso dependiente de la luz, que requiere energía, y que está estrechamente relacionado con el proceso fotosintético del alga (Florencio y Vega, 1983). El requerimiento energético es presumiblemente debido, por un lado, a una componente de transporte activo a través de permeasa y, por otro, a la reacción catalizada por la glutamina sintetasa.

El consumo de amonio se ha estudiado en varias estirpes de *C. reinhardtii*, y en todas ellas se inhibe significativamente por la presencia de MSX, conocido inhibidor de la glutamina sintetasa (Tabla I), sugiriendo que en este alga, la incorporación de amonio ocurre mayoritariamente por la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa, tal y como había sido establecido para las estirpes silvestres 6145 c (Florencio y Vega, 1982) y CCAP 11/32a (Cullimore y Sims, 1981 b). Sin embargo, entre las estirpes estudiadas, el mutante 203 muestra una velocidad de consumo de amonio excepcionalmente alta, incluso en presencia de MSX, indicando la participación, al menos en dichas condiciones, de otra ruta alternativa que no implica la actividad glutamina sintetasa.

Las células de *Chlamydomonas* que han sido sometidas a un periodo carencial de nitrógeno utilizan el  $\text{NH}_4^+$  a una velocidad considerablemente superior a la de las células normales, y ello parece ser un fenómeno general en la



asimilación del nitrógeno inorgánico por las algas verdes hambrientas de nitrógeno (Syrett y Hipkin, 1973), debido a que en ausencia de este elemento, se acumulan reservas carbonadas de forma que cuando se añade la fuente nitrogenada, el poder reductor producido en la fotosíntesis se desvía mayoritariamente hacia la asimilación de nitrógeno, hasta reponer las condiciones nutricionales normales (Thomas *et al.*, 1976).

Un gran número de evidencias experimentales relacionadas con estudios sobre la distribución de las enzimas potencialmente implicadas y su afinidad por el amonio; la actividad de sistemas aislados como por ejemplo los cloroplastos; la evolución de la radiactividad en los metabolitos nitrogenados al incorporar amonio radiactivo, así como la respuesta a distintos inhibidores específicos, han demostrado taxativamente la participación de la ruta GS-GOGAT en la asimilación del amonio, excluyendo en la mayoría de los casos, toda posibilidad de participación de la GDH (Mifflin y Lea, 1977).

En el caso de las plantas superiores esta afirmación es válida tanto para los tejidos autótrofos como para los heterótrofos del vegetal (Mifflin *et al.*, 1980). En lo que respecta a las algas, la evidencia de que la ruta GS-GOGAT podía participar en la incorporación del amonio a esqueletos carbonados comenzó cuando se identificaron en el alga verde *Chlorella* altos niveles de glutamina sintetasa (Evstigneeva *et al.*, 1974) y de GOGAT dependiente de ferredoxina (Lea y Mifflin, 1975). Posteriormente se ha sugerido que esta vía es la responsable fundamentalmente de la asimilación del amonio en estos organismos (Mifflin *et al.*, 1980), aunque existe una cierta polémica que ha surgido al proponer algunos autores la participación de una glutamato deshidrogenasa con alta afinidad por el amonio, identificada en algunas especies de algas (McKenzie *et al.*, 1979; Everest y Syrett, 1983).

La participación del ciclo GS-GOGAT en la asimilación de amonio por células de *C.reinhardtii* se confirma por que el incremento de la velocidad de utilización de amonio por células de este organismo deficientes en nitrógeno, va acompañado de un aumento significativo de las actividades Fd-GOGAT y NADH-GOGAT (Fig. 8), al igual que había sido establecido para las actividades GS (Cullimore y Sims, 1981 b; Florencio y Vega, 1983). Observaciones análogas se han encontrado en bacterias fotosintéticas (Johansson y Gest, 1977), cianobacterias (Edmon *et al.*, 1979; Tuli y Thomas, 1981), plantas superiores (Rhodes *et al.*, 1975; Paone y Stevens, 1981) y otras algas eucarióticas (Rigano *et al.*, 1981).

En *C.reinhardtii* se han separado, purificado y caracterizado recientemente dos isoenzimas con actividad GS. La isoenzima GS<sub>1</sub> predomina en células sometidas a un periodo de oscuridad, mientras que las isoformas GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub> se encuentran presentes en células crecidas a la luz, con predominio de la GS<sub>2</sub> sobre la GS<sub>1</sub> (Florencio y Vega, 1983). En este trabajo hemos separado, purificado y caracterizado dos enzimas con actividad GOGAT; una, dependiente de ferredoxina reducida, y la otra, de NADH, confirmando los datos previos apuntados por Cullimore y Sims (1981 a).

Esta dotación peculiar de las enzimas de la asimilación de amonio en nuestro alga sugiere la presencia en *Chlamydomonas* de dos sistemas GS-GOGAT; uno, GS<sub>2</sub>-Fd-GOGAT, localizado en el cloroplasto, que se ocuparía de la asimilación fotosintética del amonio, y otro, GS<sub>1</sub>-NADH-GOGAT, localizado en el citosol, que sería responsable de la asimilación del amonio producido por fotorrespiración, y de la asimilación en la oscuridad (Cullimore y Sims, 1981 a).

Sin embargo, hace falta una mayor evidencia experimental, sobre todo con respecto a la localización intracelular de las enzimas, para precisar mejor el papel fisiológico de estos sistemas GS-GOGAT en organismos fotosintéticos. En plantas superiores parece no existir una separación espacial de las actividades glutamato sintasa (Match y Takahashi, 1981; Wallsgrove *et al.*, 1982), aunque la distribución de las isoformas GS sea análoga a la que se ha sugerido para *Chlamydomonas* (Mann *et al.*, 1979; Guiz *et al.*, 1979; Hirel y Gadal, 1981; Kretovich *et al.*, 1981; Winter *et al.*, 1982).

El método utilizado en este trabajo para medir la actividad GOGAT es suficientemente sensible, y de fácil aplicación, puesto que se consigue separar el glutamato formado y valorarlo con ninhidrina en un tiempo total de 25 min, pudiéndose realizar simultáneamente hasta 20 ensayos diferentes. La separación de aminoácidos utilizando resinas de intercambio iónico ha sido últimamente muy perfeccionada (Pishak y Phillips, 1979) y ha resultado imprescindible en la puesta a punto del ensayo de la GOGAT. La utilización de aminooxiacetato en la mezcla del ensayo impide cualquier posible interferencia debida a transaminasas.

En células permeabilizadas y extractos crudos de *Chlamydomonas* pueden observarse medidas significativas de la actividad glutamato sintasa utilizando metil viológeno o ferredoxina, reducidos químicamente con ditionito, o bien piridín nucleótidos reducidos. En la literatura se hace abundante referencia a estos distintos tipos de actividad (Mifflin *et al.*, 1981).

La actividad GOGAT dependiente de piridín nucleótidos, en células permeabilizadas o extractos crudos de *C. reinhardtii* es mucho mayor con NADH que con NADPH, de forma similar a lo que sucede en la mayoría de los organismos euca-

rióticos (Mifflin *et al.*, 1981), pero al contrario de lo que ocurre en los procarióticos, donde dicha actividad es absolutamente específica para NADPH (Stewart *et al.*, 1980). No puede descartarse la posibilidad de que en los organismos eucarióticos la actividad dependiente de NADPH se deba a la presencia de una fosfatasa o transhidrogenasa (Beevers y Storey, 1976) o incluso a contaminación bacteriana.

Poco se sabe en lo concerniente a la regulación de los niveles intracelulares de las glutamato sintasas. En una estirpe de *Klebsiella aerogenes*, los niveles más altos de actividad se encontraron en condiciones de baja disponibilidad de amonio (Meers *et al.*, 1970), mientras que en otra estirpe, altas concentraciones de amonio en el medio de cultivo rendían los niveles más elevados de glutamato (Brenchley *et al.*, 1973). Tyler (1978) ha sugerido que, en bacterias, altas concentraciones de glutamato y bajas de amonio y glutamina, producen los niveles más bajos de síntesis enzimática.

En los organismos fotosintéticos, hay muy pocos estudios relativos a la regulación. En *Lemna minor*, los niveles más altos de actividad glutamato sintasa se encontraron en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno (Rhodes *et al.*, 1976), al igual que ocurre en *C. reinhardtii* (Cullimore y Sims, 1981 *b*; este trabajo). Por otra parte, se ha descrito retroinhibición por aminoácidos en la Fd-GOGAT de *Vicia faba* (Wallsgrave *et al.*, 1977) y en la NADH-GOGAT de nódulos de altramuza (Boland y Benny, 1977). Por último, también se ha reportado una regulación por la luz para la glutamato sintasa de *Chlorella sorokiniana*, mediada por la enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa, que reduciría tiorredoxina a partir de la ferredoxina reducida fotosintéticamente, siendo la tiorredoxina reducida la que activaría a la GOGAT (Tischner y Schmidt, 1982).

Los resultados mencionados en el apartado III.C sobre los niveles de las actividades GOGAT en diferentes condiciones de cultivo, intentan aportar algo de luz al estudio de la significación biológica y regulación *in vivo* de las glutamato sintetasas de *C.reinhardtii*, aspecto que, como hemos mencionado anteriormente, es prácticamente desconocido en los organismos fotosintéticos.

La Fig. 7 pone de manifiesto que ni la Fd-GOGAT, ni la NADH-GOGAT, se inhiben significativamente por la oscuridad, lo que pone en duda que en *C.reinhardtii* exista para estas enzimas un tipo de regulación dependiente de transiciones luz-oscuridad, según se ha establecido para otras proteínas del metabolismo fotosintético del nitrógeno, como particularmente, la glutamina sintetasa de este mismo alga (Cullimore, 1981; Florencio y Vega, 1983) y la actividad GOGAT de *Chlorella sorokiniana* (Tischner y Schmidt, 1982). Por el contrario, la actividad NADH-GOGAT sufre un incremento considerable en células creciendo en la oscuridad, lo que sugiere que esta enzima está implicada en la asimilación de amonio en las condiciones en las que la Fd-GOGAT no es operativa debido a que no puede generarse, por la maquinaria fotosintética, ferredoxina reducida, necesaria para que actúe dicha enzima.

El nivel intracelular de actividad GOGAT en *C.reinhardtii* viene también determinado por la concentración ambiental de CO<sub>2</sub> (Fig. 7), siendo más bajo en células crecidas con aire solo que con aire enriquecido en CO<sub>2</sub>. Esta observación puede guardar un paralelismo interesante con la excreción de amonio observada por Azuara y Aparicio (1984), cuando las células de *C.reinhardtii* se crecen a la concentración de CO<sub>2</sub> que lleva el aire. Particularmente importante resulta la disminución de la actividad NADH-GOGAT cuando se burbujea un cultivo sólo con aire, condiciones en las que la actividad fotorrespiratoria es máxima (Birmingham *et al.*, 1982), pues contradice la hipótesis de Culli

more y Sims (1981 b), que atribuye a la NADH-GOGAT un papel de reasimilación del amonio que se libera durante la fotorrespiración.

Por otra parte, el incremento del nivel intracelular de la NADH-GOGAT observado en células hambrientas de nitrógeno (Fig. 8), favorece la idea de asignar a la NADH-GOGAT el papel de reciclar el amonio liberado durante el "turnover" o recambio de proteínas, que es especialmente activo en estas condiciones de cultivo (Thacker y Syrett, 1972).

Al someter extractos crudos de *Chlamydomonas reinhardtii* a una cromatografía en DEAE-Sefacel, se han separado dos actividades glutamato sintetas; una, dependiente de NADH, y otra, de ferredoxina reducida, como donador de electrones. La cromatografía de intercambio iónico ha permitido también poner de manifiesto la existencia de NADH-GOGAT y Fd-GOGAT en distintos tejidos de plantas superiores, como cotiledones de guisante (Match *et al.*, 1979 b), soja (Storey y Reporter, 1978), tallos verdes y etiolados de guisante (Match *et al.*, 1980 b; Match y Takahashi, 1981); hojas de soja y cebada (Wallsgrave *et al.*, 1982), semillas de guisante (Match y Takahashi, 1982), y hojas de tomate (Avila *et al.*, 1984).

Nuestros resultados indican que una actividad MVH-GOGAT está asociada tanto con la NADH-GOGAT, como con la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*, lo que está en buena consonancia con los datos observados para la Fd-GOGAT de plantas superiores (Wallsgrave *et al.*, 1977), pero sin embargo contradice los de Cullimore y Sims (1981 a), obtenidos precisamente en *C. reinhardtii*, y que indican que la actividad MVH-GOGAT sólo está asociada con la NADH-GOGAT y no con la Fd-GOGAT.

La cromatografía de afinidad en Cibacrón-Sefarosa ha sido de tremenda utilidad en la purificación de enzimas dependientes de piridín nucleótidos (Pharmacia Fine Chemicals, 1979). Concretamente, ha constituido una etapa fundamental en la purificación hasta homogeneidad electroforética de la NADH-GOGAT de guisante (Match *et al.*, 1980 b) y de semillas de soja (Chiu y Shargool, 1979). En el caso de la NADH-GOGAT de *Chlamydomonas*, esta técnica nos ha supuesto un buen paso de purificación, pero no ha tenido la capacidad de resolver definitivamente la enzima debido a su baja afinidad por el adsorbente, ya que sólo un pequeño aumento de fuerza iónica era suficiente para evitar la adsorción de la NADH-GOGAT a la Cibacrón-Sefarosa.

La preparación de NADH-GOGAT de *C. reinhardtii* obtenida en nuestro caso tenía una actividad específica de 4,6 U·mg<sup>-1</sup>, con un factor de purificación de 350 veces, y aunque no resultó ser electroforéticamente homogénea, ha constituido un buen material de trabajo para la determinación de parámetros fisicoquímicos y cinéticos de la proteína.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que la NADH-GOGAT de *C. reinhardtii* es un complejo enzimático donde pueden ensayarse tres actividades diferentes. Por una parte, la actividad fisiológica, que cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, con el concurso del NADH. En segundo lugar, la actividad MVH-GOGAT, antes mencionada. Por último, una actividad NADH-diaforasa que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH, sustrato fisiológico, hasta el ferricianuro, aceptor artificial de electrones. Hasta la fecha, sólo se había mencionado la existencia de una actividad NADH-diaforasa asociada a la NADH-GOGAT de guisante (Match *et al.*, 1980 b).

Es importante señalar la gran especificidad por sustratos que muestra la NADH-GOGAT de *C.reinhardtii*. Esta proteína es exclusivamente dependiente de NADH como donador de electrones, y de glutamina y 2-oxoglutarato como donador y aceptor del grupo  $-NH_2$  respectivamente. Análogamente se comportan la NADH-GOGAT de plantas superiores (Beevers y Storey, 1976; Kang y Titus, 1981; Chiu y Shargool, 1979) y otras algas (Miyatake y Kitaoka, 1981). Por su parte, en los organismos procarióticos estudiados, la GOGAT, aunque es rigurosamente específica por NADPH como donador de electrones, también puede trabajar con amonio como donador de nitrógeno, en sustitución de glutamina, y en ausencia de 2-oxoglutarato, provocando la hidrólisis de la glutamina (Tyler, 1978; Stewart *et al.*, 1980).

En este trabajo se describe por primera vez, la inhibición por sustratos de una NADH-GOGAT (Tabla XI). También el  $NAD^+$ , producto de la reacción, es un buen inhibidor -probablemente competitivo con el NADH- de la actividad, que, por otra parte, no se afecta por glutamato. Estas observaciones pueden tener, sin duda, un gran valor, porque sugieren la posibilidad de que esta actividad esté modulada, *in vivo*, por unas condiciones intracelulares específicas, determinadas por las concentraciones de sustratos y productos de la reacción. La inhibición por  $NAD^+$  y glutamato fue puesta de manifiesto en la NADH-GOGAT de nódulos de altramuza (Boland y Benny, 1977) y de corteza de manzana (Kang y Titus, 1981), donde el  $NAD^+$  es inhibidor competitivo respecto al NADH, y el glutamato lo es frente al 2-oxoglutarato.

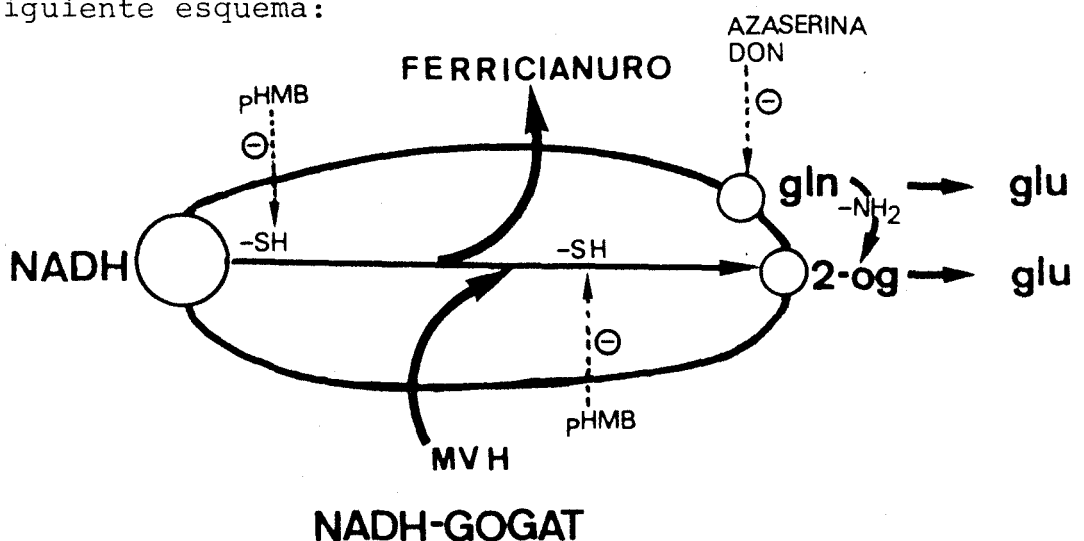
Azaserina y DON son potentes inhibidores de la NADH-GOGAT de *C.reinhardtii*, al igual que ocurre con las correspondientes enzimas de otras fuentes biológicas (Stewart *et al.*, 1980; Mifflin *et al.*, 1981). Es interesante señalar que dichos inhibidores afectan también muy significativamente a la actividad MVH-GOGAT del complejo enzimático



co, mientras que no tienen efecto negativo sobre la actividad NADH-ferricianuro reductasa. Esto es lógico, ya que al ser estos inhibidores análogos de glutamina, sólo inhiben aquellas actividades que la utilizan como sustrato.

Particular interés tiene la inhibición de la NADH-GOGAT por pHMB, que se ha puesto repetidas veces de manifiesto en la enzima de plantas superiores (Suzuki y Gadal, 1982; Wallsgrove *et al.*, 1982; Match *et al.*, 1980 b), e indica la esencialidad de grupos -SH de la proteína para que se exprese la actividad enzimática. El pHMB afecta de forma diferente a las distintas actividades del complejo enzimático NADH-GOGAT, siendo la actividad NADH-ferricianuro reductasa la más resistente a dicha inhibición. En términos generales, este efecto inhibitor del pHMB era superior cuando la enzima se preincubaba previamente con el inhibidor, en presencia de glutamina y 2-oxoglutarato (Tabla X), indicando que la unión de los sustratos puede inducir en la proteína una conformación tal que hace más fácilmente accesibles al pHMB a los grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad. Estos grupos deben estar próximos al sitio activo del NADH, ya que la actividad NADH-diaforasa del complejo es también sensible a este tipo de incubación con el pHMB y los sustratos.

Los datos anteriormente mencionados permiten sugerir, para el complejo enzimático NADH-GOGAT de *C.reinhardtii*, el siguiente esquema:



El peso molecular del complejo NADH-GOGAT de *C.reinhardtii* es 368.000 , que resulta significativamente más elevado que el publicado por Cullimore y Sims (1981 a) para esta misma enzima. Nuestro estudio ha sido más exhaustivo, y hemos utilizado una preparación enzimática de mejor calidad que los autores ingleses, que trabajaron con extractos crudos. Sin embargo, el peso molecular de plantas superiores y hongos, oscila entre 200.000 y 235.000 (Match *et al.*, 1980 b; Boland y Benny, 1977; Hummelt y Mora, 1980). Por su parte, las NADPH-GOGATs de organismos procarióticos muestran pesos moleculares comprendidos entre 200.000 y 800.000 (Yelton y Yoch, 1981), dependiendo de las condiciones de extracción y purificación, ya que se han encontrado dos formas moleculares de la proteína; una, de 200.000, cuando no se incluye NaCl en los tampones, y, otra, de 800.000, cuando se incluye dicha sal. Estos datos sugieren que la proteína podría presentar diversos estados de agregación de un mismo monómero con actividad catalítica, correspondiendo la forma de alto peso molecular a un tetrámero de la proteína de más bajo peso molecular. Si tenemos en cuenta que la NADPH-GOGAT de 200.000 de peso molecular contiene una subunidad grande de 150.000 y otra de 50.000 (Adachi y Suzuki, 1977; Trotta *et al.*, 1974), la sugerencia hecha anteriormente es compatible con la estructura propuesta para las NADPH-GOGAT de *E.coli* y *B.megaterium* (peso molecular aproximado, 800.000), que contienen 4 subunidades de 150.000 y otras 4 de 50.000 (Miller y Stadman, 1972; Hemmi *et al.*, 1978).

Aunque la preparación obtenida de NADH-GOGAT no es electroforéticamente homogénea, los datos del espectro de absorción de dicha preparación, así como el efecto inhibitorio de la batofenantrolina, conocido quelante de hierro, son compatibles con las siguientes hipótesis:

- a) Presencia de un componente flavínico, que es funcional durante la catálisis.

- b) Existencia de una agrupación sulfoférica, como grupo prostético del complejo enzimático, que, por otra parte carece de hemo.

Las características del espectro de absorción de nuestra preparación de NADH-GOGAT son análogas a las de las enzimas de nódulos de altramuz (Boland y Benny, 1977) y tallos etiolados de guisante (Match *et al.*, 1980 b), para las que se ha sugerido la presencia de flavinas (FMN, en concreto, en el primero de los casos) como grupos prostéticos. En este sentido, existe también una gran similitud con las NADPH-GOGATs de bacterias, que son enzimas oligoméricas que contienen FMN, FAD y una agrupación sulfoférica, como grupos prostéticos (Stewart *et al.*, 1980).

La Tabla XXIV muestra un estudio de las NAD(P)H-GOGATs de distintas fuentes biológicas, en comparación con los datos obtenidos para la NADH-GOGAT de *C. reinhardii*.

A continuación, pasamos a discutir los resultados relativos a la purificación y caracterización de la ferredoxina de *Chlamydomonas reinhardii*.

La ferredoxina de *C. reinhardii* ha sido una proteína bastante utilizada en la investigación científica. Así, se ha empleado como proteína marcadora del cloroplasto en estudios de transcripción y traducción (Armstrong *et al.*, 1971); en estudios inmunológicos sobre su proceso biosintético (Huisman *et al.*, 1979), y en las caracterizaciones de ferredoxinas por mapeo de péptidos trípticos (Huisman *et al.*, 1978). Sin embargo, aunque esta proteína se había purificado anteriormente (Mitsui, 1971; Huisman *et al.*, 1979; Gorman y Levine, 1966), no se habían descrito hasta ahora sus propiedades fisicoquímicas.

TABLA XXIV. PROPIEDADES DE ALGUNAS GLUTAMATO SINTASAS DEPENDIENTES DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS

A. ORGANISMOS EUKARIOTICOS

Fuente biológica	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	tallos etiolados <i>Pisum sativum</i>	nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Referencia	Este trabajo	Cullimore y Sims 1981 a	Match <i>et al.</i> 1980 b	Boland y Benny 1977	Hummelt y Mora 1980
Donador de electrones	NADH	NADH	NADH	NADH	NADH
Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> )	4,6	n.d.	15,6	36,0	24,0
Peso molecular	368.000	240.000	220.000	235.000	200.000
Subunidades	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
Radio de Stokes (nm)	8,9	5,6	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de sedimentación (S)	9,9	10,5	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de fricción	1,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pH óptimo	7,0	7,5	7,6	8,5	n.d.
Temperatura óptima (°C)	40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Energía de activación (kJ·mol <sup>-1</sup> )	38,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K <sub>m</sub> NADH (μM)	8	13	4	1,3	n.d.
K <sub>m</sub> 2-oxoglutarato (μM)	18	7	37	39	n.d.
K <sub>m</sub> glutamina (μM)	600	900	400	400	n.d.
K <sub>m</sub> metil viológeno (μM)	1.500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Grupos prostéticos:					
Flavinas (moles por mol)	+	n.d.	+	2 FMN	-
Agrupación sulfoférica	+	n.d.	-	-	-
Máximos de absorción	275;420	n.d.	275;375;440	276;375;455	-

n.d = no determinado; + = presente, pero no cuantificado; -= no observado

TABLA XXIV. PROPIEDADES DE ALGUNAS GLUTAMATO SINTASAS DEPENDIENTES DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS

B. ORGANISMOS PROCARIOTICOS

Fuente biológica	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
Referencia	Miller y Stadtman 1972	Trotta <i>et al.</i> 1974	Adachi y Suzuki 1977	Hemmilä y Mantsälä, 1978	Yelton y Yoch 1981
Donador de electrones	NADPH	NADPH	NADPH	NADPH	NADPH
Actividad específica (U·mg <sup>-1</sup> )	52,4	36,6	18,6	47,6	n.d.
Peso molecular	800.000	227.000	280.000	840.000	840.000 263.000
Subunidades	4 x 135.000 4 x 53.000	1 x 175.000 1 x 51.000	1 x 94.000 1 x 72.000	4 x 142.000 4 x 55.000	n.d.
Radio de Stokes (nm)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de sedimentación(S)	20	17,6	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de fricción	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pH óptimo	7,6	7,8	7,3-7,8	7,3	8,0
Temperatura óptima	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43
Energía de activación( kJ ·mol <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K <sub>m</sub> NADPH (μM)	7,7	12	3	7,1	15
K <sub>m</sub> 2-oxoglutarato (μM)	7,3	300	50	9	35
K <sub>m</sub> glutamina (μM)	250	300	1100	200	300
K <sub>m</sub> metil viológeno (μM)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Grupos prostéticos:					
Flavinas (moles por mol)	4 FAD : 4 FMN	1 FAD : 1 FMN	+	n.d.	+
Agrupación sulfoférrica	38 Fe : 30 S	7 Fe : 13 S	+	n.d.	+
Máximos de absorción	278;380;440	278;375;447	280;380;450	n.d.	280;373;450;475

n.d.= no determinado; +=presente,pero no cuantificado

En nuestro caso, hemos conseguido purificar la ferredoxina hasta homogeneidad electroforética por un procedimiento bastante fácil, obteniendo rendimientos significativamente superiores a los reportados para las proteínas de algas verdes y plantas superiores (Matsubara, 1968; Huisman *et al.*, 1977; Thauer *et al.*, 1978; Buchanan y Arnon, 1971). Este hecho, junto con el simple tratamiento necesario para romper las células, coloca a *Chlamydomonas reinhardtii* como un organismo idóneo para obtener cómodamente grandes cantidades de ferredoxina "tipo planta".

Aunque algunas plantas superiores (Takahashi *et al.*, 1981; Matsubara *et al.*, 1978) y cianobacterias (Hutson *et al.*, 1978; Cammack *et al.*, 1977), contienen dos especies moleculares de ferredoxina, en *C. reinhardtii* sólo se ha detectado un único tipo de proteína.

Las propiedades espectroscópicas de la ferredoxina de *C. reinhardtii*, en su forma oxidada, son casi idénticas a las descritas previamente (Huisman *et al.*, 1979; Gorman y Levine, 1966). Sin embargo, hemos encontrado hombros de absorción en la ferredoxina reducida a 284; 310; 390; 469 y 537 nm, algunos de los cuales, hasta ahora, no habían sido descritos para una ferredoxina cloroplástica. La ferredoxina reducida de espinaca muestra un marcado pico a 276 nm; un hombro a 312 nm, y un hombro ancho entre 450 y 470 nm (Tagawa y Arnon, 1962), pero los espectros de la proteína, en su forma reducida, procedente de otras fuentes biológicas, no se han analizado en la región ultravioleta (Wickramasinghe, 1974; Buchanan y Arnon, 1971; Hall *et al.*, 1975; Matsubara, 1968; Mitsui, 1971; Huisman *et al.*, 1977).

La ferredoxina purificada de *C. reinhardtii* mostró una relación de absorbancias  $A_{420}/A_{276}$ , de 0,51, similar al valor de 0,49 reportado para las ferredoxinas de *Petunia axillaris* y de espinaca (Huisman *et al.*, 1977; Bucha-

nan y Arnon, 1971). Por otra parte, el coeficiente de extinción a 420 nm de la ferredoxina de *C.reinhardtii* es inferior al encontrado para *Scenedesmus* (8,4 versus 9,8  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Matsubara, 1968).

En lo que respecta a las propiedades fisicoquímicas, la ferredoxina de *C.reinhardtii* mostró las propiedades típicas de las ferredoxinas "tipo planta". Así, se ha determinado la presencia de 2 átomos de hierro y 2 de sulfuro inorgánico lábil por molécula de proteína que, conjuntamente con los datos obtenidos por EPR, indican la presencia de un centro {2Fe-2S}, característico de todas las ferredoxinas de este tipo (Wickramasinghe y McIntosh, 1974; Wickramasinghe, 1974; Buchanan y Arnon, 1971; Hall *et al.*, 1975). El punto isoeléctrico de la ferredoxina de *C.reinhardtii*, su potencial redox y su comportamiento como transportador de 1 electrón, son acordes a los datos encontrados en ferredoxinas de organismos eucarióticos (Wickramasinghe, 1974; Buchanan y Arnon, 1970; Tagawa y Arnon, 1968; Dutton y Rogers, 1978; Ke *et al.*, 1974).

La ferredoxina de *C.reinhardtii* contiene metionina y triptófano, que suelen estar ausentes en las ferredoxinas "tipo planta" (Matsubara, 1968; Mitsui, 1971; Hase *et al.*, 1983; Takahashi *et al.*, 1983), y un alto contenido en alanina. La gran proporción de aminoácidos ácidos sobre los básicos, explica el carácter ácido de esta proteína, como lo demuestra su bajo punto isoeléctrico (pI = 3,30) y su fuerte adsorción en las columnas de intercambio aniónico.

Es interesante resaltar que cuando la ferredoxina purificada de *Chlamydomonas* se reduce con ditionito, mantiene sus propiedades fisiológicas, actuando como un donador de electrones efectivo para el funcionamiento de actividades enzimáticas, como es el caso de la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*. Por otra parte, la ferredoxina se comporta como un adsorbente muy efectivo de la mencionada enzima en la cromatografía de afinidad con Fd-Sefarosa.

La relativa facilidad de obtener grandes cantidades de esta proteína, no cabe duda de que permitirá en el futuro completar los estudios en orden a dilucidar la estructura completa de la ferredoxina.

En este trabajo se ha purificado hasta homogeneidad la ferredoxina-glutamato sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii*, y se ha hecho un estudio de los parámetros fisicoquímicos y cinéticos más relevantes de la proteína, así como un estudio de su composición en grupos prostéticos y mecanismo catalítico.

Los estudios de purificación hasta homogeneidad, reportados hasta la fecha, de los organismos fotosintéticos, se caracterizan, por lo general, por la baja recuperación final de la actividad, que suele oscilar entre el 14 y el 24 % (Suzuki *et al.*, 1982; Hirasawa y Tamura, 1984). Esto puede deberse, y así lo ha confirmado nuestra experiencia, a pérdida de grupos prostéticos, por parte de la enzima, durante los tratamientos de purificación, y, también, a la inactivación durante los primeros estadios de la purificación. Nuestros intentos de estabilizar la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii* sólo han sido positivos cuando añadíamos a los tampones de trabajo DTE y EDTA (apartado III.B). En este contexto, Matoh *et al.* (1979 *a*) observaron que la presencia de inhibidores de proteasas (fenilmetil-sulfonil fluoruro, PMSF, ó diisopropilfluorofosfato, DFP), así como de protectores de grupos sulfhidrilos del tipo del mercaptoetanol o ditiogeritritol, y también de 2-oxoglutarato, era fundamental para estabilizar la enzima de hojas de maíz. Por su parte, Hirasawa y Tamura (1984) observaron que la adición de PMSF, mercaptoetanol, NaCl y 2-oxoglutarato a los tampones de extracción y purificación de la Fd-GOGAT de espinaca, era esencial para mejorar la calidad de la preparación enzimática obtenida (ver Tamura *et al.*, 1980).



En el método de purificación que proponemos para la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* hay una etapa, la cromatografía en hidroxilapatito, que, además de ser un proceso lento, presenta pérdidas bastante significativas de la actividad enzimática. Aunque el hidroxilapatito fue desechado por Match *et al.* (1979a) en la purificación de la Fd-GOGAT de hojas de maíz por las significativas pérdidas de actividad que presentaba, en nuestro caso, y a pesar de los inconvenientes encontrados, resultó ser una etapa necesaria para obtener la purificación hasta homogeneidad de la enzima.

Estudios previos han demostrado que la Fd-Sefarosa es un efectivo adsorbente para la purificación por afinidad de un grupo importante de enzimas dependientes de ferredoxina, como la Fd-nitrito reductasa de hojas de espinaca (Ida, 1977), la Fd-nitrato reductasa de cianobacterias (Manzano *et al.*, 1978), Fd-NADP<sup>+</sup> reductasa (Shin y Oshino, 1978), y Fd-GOGAT de plantas superiores (Wallsgrave *et al.*, 1977; Match *et al.*, 1979 a; Suzuki y Gadal, 1982; Hirasawa y Tamura, 1984). Esta efectividad de la Fd-Sefarosa se ha confirmado también en nuestro caso con la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, como muestra la Fig. 30, si bien la enzima se eluye de la columna con 0,09 M de NaCl, mientras que la fuerza iónica necesaria para la elución de la correspondiente enzima de hojas de maíz fue de 0,4 M de NaCl (Match *et al.*, 1979 a), y 0,1 M de NaCl para la enzima de plantas superiores (Suzuki y Gadal, 1982; Wallsgrave y Mifflin, 1977).

Nosotros obtuvimos preparaciones, electroforéticamente homogéneas, de Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* con una actividad específica de  $6,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , mientras que la actividad específica obtenida para otras Fd-GOGATs de plantas superiores, purificadas hasta homogeneidad electroforética, era sensiblemente superior ( $35,88 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  en arroz, Suzuki y Gadal, 1982;  $105 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  en espinaca, Hirasawa y Tamura, 1984).

Es importante destacar que, hasta la fecha, sólo se habían purificado hasta homogeneidad las Fd-GOGATs de algunas plantas superiores, por lo que este trabajo representa, por vez primera, la purificación hasta homogeneidad de la Fd-GOGAT de un microorganismo fotosintético.

La Fd-GOGAT purificada de *C.reinhardtii* es altamente específica por glutamina y 2-oxoglutarato, como donador y aceptor, respectivamente, del grupo  $-NH_2$ . Sin embargo, la especificidad por Fd no es tan absoluta, ya que puede ser sustituida por metil viológeno, como transportador de electrones a la proteína, si bien la afinidad de la enzima por su sustrato fisiológico, la ferredoxina, es mucho mayor que por el metil viológeno. Este comportamiento en cuanto a la especificidad por los sustratos es análogo al observado para otras Fd-GOGATs de plantas superiores (Arima, 1978; Match *et al.*, 1979 a; Suzuki y Gadal, 1982; Wallsgrove *et al.*, 1977; Hirasawa y Tamura, 1984).

Con respecto a los sustratos, es interesante observar que la actividad Fd-GOGAT, en *C.reinhardtii*, al igual que ocurre con la NADH-GOGAT anteriormente mencionada, se inhibe significativamente por altas concentraciones de 2-oxoglutarato, mientras que la glutamina no ejerce efecto negativo sobre la actividad. Hasta ahora, no podemos hacer una valoración exacta sobre la repercusión fisiológica de esta inhibición.

Al estudiar el efecto inhibitorio producido por agentes químicos de distinta naturaleza, la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* se comporta de forma análoga a como lo hacen las correspondientes enzimas de hojas de plantas superiores. Azaserina (*o*-diazacetil-L-serina) y DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucina) análogos de glutamina, son potentes inhibidores de todas las Fd-GOGATs estudiadas hasta la fecha (Wallsgrove *et al.*, 1977; Match *et al.*, 1979 a; Suzuki y Gadal, 1982; Hirasawa y Tamura, 1984), incluyendo la de *C.reinhardtii*

(Tabla XX). Sin embargo, la albizziina (L-2-amino-3-ureido-propiónico), otro análogo de glutamina, en ningún caso presenta efecto inhibitorio, lo que hace pensar que es el grupo diazo de los primeros, la parte de la molécula que ejerce la inhibición que, por otra parte, resulta ser irreversible.

Dado que el aminooxiacetato, inhibidor de transaminasas, no inhibe a la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, se pone de manifiesto que la reacción catalizada por esta proteína difiere ampliamente, en cuanto a su mecanismo, de las reacciones típicas de transaminación. Por otra parte, la sensibilidad de la enzima al verde de bromocresol y al ácido flaviánico, inhibidores de glutaminasa, sugiere que la hidrólisis de glutamina en la enzima, tiene lugar por un mecanismo similar al que se da en la glutaminasa.

Las Fd-GOGATs de hojas de maíz (Match *et al.*, 1979 a), y espinaca (Hirasawa y Tamura, 1984), así como la de *C.reinhardtii* (Tabla XX), son muy sensibles a la inhibición por pHMB, indicando la esencialidad de grupos tiólicos para la acción catalítica de la proteína.

Por otra parte, es interesante señalar la resistencia a la degradación térmica que presenta la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* (Fig. 33), sobre todo si se la compara con la NADH-GOGAT de este organismo (Fig. 19).

La Tabla XXV recoge parámetros moleculares y cinéticos de las Fd-GOGATs procedentes de organismos fotosintéticos, en comparación con los calculados en este trabajo para la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*. Los pesos moleculares de las Fd-GOGATs oscilan entre 145.000 y 224.000, y, en general, todas las proteínas están compuestas por una sola cadena polipeptídica, con la excepción de la enzima de hojas de arroz, que aparentemente está integrada por dos subunidades cada una (Suzuki y Gadal, 1982). También se muestran

TABLA XXV. PROPIEDADES DE ALGUNAS Fd-GLUTAMATO SINTASAS

Fuente biológica	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	hojas de <i>Zea mays</i>	hojas de <i>Spinacea oleracea</i>	hojas de <i>Vicia faba</i>	hojas de <i>Oryza sativa</i>
Referencia	Este trabajo	Cullimore y Sims 1981 a	Match <i>et al.</i> 1979 a	Hirasawa y Tamura 1984	Wallsgrove <i>et al.</i> , 1977	Suzuki <i>et al.</i> 1982
Peso molecular	146.000	165.000	160.000	140.000	145.000	224.000
Subunidades	1	n.d.	n.d.	1	n.d.	2 x 115.000
Radio de Stokes (nm)	4,1	4,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de sedimentación (S)	8,3	8,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Coefficiente de fricción	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pH óptimo	7,5	7,5	6,9	7,5-8,5	7,0-7,6	7,3
Temperatura óptima (°C)	35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Energía de activación (kJ · mol <sup>-1</sup> )	84,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K <sub>m</sub> ferredoxina (μM)	15	0,01	1,7	1	2	5,5
K <sub>m</sub> 2-oxoglutarato (μM)	1.000	170	240	89	150	330
K <sub>m</sub> glutamina (μM)	700	190	1.100	556	330	270-570
K <sub>m</sub> metil viológeno (μM)	4.700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Grupos prostéticos:						
Flavinas	1 FAD : 1 FMN	n.d.	--	1 FAD : 1 FMN	-	-
Agrupación sulfoferrica	{3Fe-4S}	n.d.	-	{4Fe-4S} ó 2 {2Fe-2S}	-	-
Máximos de absorción	278;377;437	n.d.	-	279;360;438	-	-
A <sub>278</sub> /A <sub>437</sub>	7,0-7,5	n.d.	n.d.	5,0	n.d.	n.d.
Actividad específica	6,5	n.d.	14,1	105	7,0	35,9

n.d. = no determinado

- = no observado

energía de activación, pH y temperatura óptimos,  $K_m$  aparentes para glutamina, 2-oxoglutarato y ferredoxina (sustratos fisiológicos), y para metil viológeno (sustrato no fisiológico). Como puede apreciarse, las  $K_m$  para estos sustratos oscilan, en los diferentes organismos estudiados, desde 0,2 a 1 mM para glutamina; 89 a 330  $\mu$ M para 2-oxoglutarato, y 1 a 5,5  $\mu$ M para ferredoxina. Es interesante señalar que en este trabajo se suministra, por vez primera en una Fd-GOGAT, la  $K_m$  de la enzima para metil viológeno (4,7 mM), y llama la atención que la  $K_m$  que presenta la enzima por su donador de electrones fisiológico, la ferredoxina, es mucho más baja (15  $\mu$ M), indicando una mayor afinidad por él que por el transportador artificial metil viológeno, tal y como había sido mencionado anteriormente.

Las características espectrales observadas de la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, aportan datos originales y muy relevantes a los resultados obtenidos para otras Fd-GOGATs de organismos fotosintéticos, puesto que no se había detectado absorción en la región visible del espectro (Wallsgrave *et al.*, 1977; Tamura *et al.*, 1980; Suzuki y Gadal, 1982), con la excepción de los datos recientemente publicados por Hirasawa y Tamura (1984) quienes, mejorando el procedimiento de purificación respecto al que habían reportado anteriormente (ver Tamura *et al.*, 1980), han observado para la enzima de espinaca, un espectro de absorción muy similar al de *C.reinhardtii*, con máximos a 279, 360 y 438 nm. Estos resultados, son también similares a los obtenidos para la NADPH-GOGAT de *E.coli* y otras bacterias (Tabla XXIV, B).

Los espectros de absorción mostrados en la Fig. 39 para la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* ponen de manifiesto la presencia de, al menos, un grupo prostético flavínico en la preparación enzimática, y permiten excluir, con toda seguridad, la presencia de grupos hemínicos. El hecho de que el 2-oxoglutarato, sustrato fisiológico, sea capaz de reoxidar la enzima previamente reducida, indica que dicho com

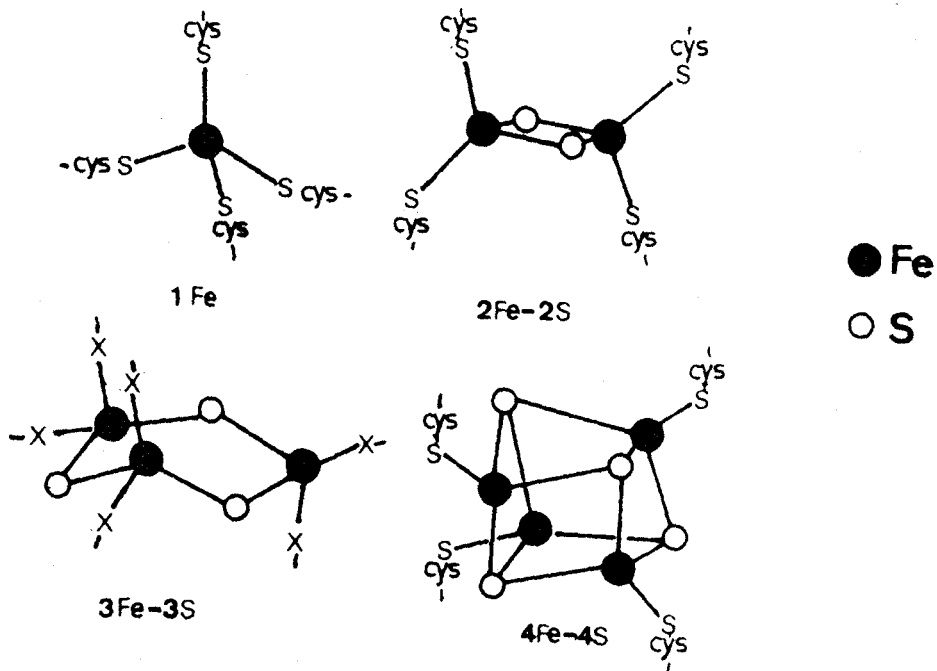
ponente flavínico es funcional durante la catálisis.

Los estudios de absorción y fluorescencia de los componentes flavínicos de la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, una vez extraídos de la proteína, confirman la presencia de FMN y FAD en la enzima, en cantidades equimoleculares, a razón de 1 FAD y 1 FMN por molécula de proteína (Tabla XXII), si bien las cantidades medidas de los distintos flavín nucleótidos fueron siempre inferiores a las propuestas, ya que es probable que haya habido pérdidas de dichos grupos durante la purificación de la enzima, siendo estas pérdidas más significativas para el FMN. Estos datos están también de acuerdo con los reportados para la Fd-GOGAT de espinaca (Hirasa wa y Tamura, 1984), y son similares a los reportados para las NADPH-GOGATs bacterianas.

Cuando se realiza el espectro diferencial de la Fd-GOGAT nativa de *Chlamydomonas reinhardtii*, minus grupos prostéticos flavínicos liberados por desnaturalización térmica de la proteína, obtenemos, al menos teóricamente, el espectro de absorción de la deflavoenzima, que se caracteriza por su absorción visible con máximos a 317, 400, 470 y 495 nm (Fig. 42), lo que sugiere la presencia de una agrupación sulfoférica en la enzima. Para establecer esta idea, nos basamos en los estudios espectrofotométricos de flavoenzimas con agrupaciones sulfoféricas hechos por Rajagopalan y Handler (1964), que encontraron que todas las deflavoenzimas estudiadas presentaban máximos característicos a 320, 420 y 470 nm.

La presencia de una agrupación sulfoférica como grupo prostético de la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, se pone de manifiesto inequívocamente por el análisis químico de la enzima, que mostró la existencia de 3 átomos de hierro y 4 de azufre inorgánico lábil por molécula (Tabla XXIII), además del contenido en flavinas antes mencionado.

Según Orme-Johnson y Orme-Johnson (1982), existen evidencias estructurales que indican la participación de 6 grupos sulfoferricos distintos en las proteínas. Estos grupos son los del tipo 1 Fe, {2Fe-2S}, {3Fe-3S} y {4Fe-4S}, que se presentan a continuación:



además de los dos tipos de centros sulfoferricos presentes en la nitrogenasa, cuyas estructuras no han sido completamente identificadas. Existe una cierta controversia respecto al contenido en azufre inorgánico lábil de los centros de 3Fe, por lo que a menudo se refiere a estos centros como {3Fe-XS}, habiéndose sugerido recientemente la existencia de centros {3Fe-4S} (Beinert y Thomson, 1983).

Los estudios de EPR de la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii* y el análisis químico de la proteína sugieren que nuestra enzima contiene un centro sulfoferrico del tipo {3Fe-4S}, basándonos en las siguientes observaciones:

- a) La enzima muestra una señal isotrópica exclusiva de su estado oxidado, ya que desaparece cuando se reduce en cualquiera de las condiciones probadas, siendo estos resultados compatibles con los presentados por otras proteínas con grupos sulfoferricos del tipo {3Fe-XS} (Xavier *et al.*, 1981; Beinert y Thomson, 1983), incluyendo la NADPH-GOGAT de *E. coli* y *Azotobacter vinelandii* (Orme-Johnson y Orme-Johnson, 1982).
- b) En condiciones reducidas (presencia de un exceso de ditionito, solo o con ferredoxina o metil viológeno), la

Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* no presenta paramagnetismo alguno (espectro de EPR plano), lo que nos hace pensar que el grupo sulfoférico de nuestra preparación no es ni del tipo {2Fe-2S} ni {4Fe-4S}, ya que éstos muestran, en condiciones reducidas, señales de EPR con simetría axial o rómbica característica (Xavier *et al.*, 1981).

- c) No es probable la presencia de una agrupación {4Fe-4S} de alto potencial (HiPIP) puesto que este tipo de agrupación sólo muestra señal de EPR, de tipo axial o rómbico, en un estado oxidado (Sweeney y Rabino-witz, 1980; Xavier *et al.*, 1981), y la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* no presentaba señal de este tipo, ni siquiera reoxidándola con ferricianuro.

En cualquier caso, los estudios de EPR no pueden, por sí solos, establecer inequívocamente el tipo de agrupación sulfoférica presente en la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii*, por lo que se necesita el uso de otras técnicas, como la espectroscopía Mössbauer y el dicroísmo magnético circular, para diagnosticar definitivamente la naturaleza de este grupo. En nuestro caso esto resulta evidente, ya que las características de saturación por la temperatura de la señal de EPR son diferentes a las observadas para centros {3Fe-XS} (Xavier *et al.*, 1981; Beinert y Thomson, 1983), y la intensidad de la señal es inferior a un electrón.

El estudio analítico de la Fd-GOGAT de espinaca, hecho recientemente por Hirasawa y Tamura (1984), ha puesto de manifiesto la presencia, en cada molécula de enzima, de 4 átomos de hierro y 4 de sulfuro lábil, por lo que estos autores han asumido que la proteína debe contener, como grupo prostético, un centro del tipo {4Fe-4S} o dos centros del tipo {2Fe-2S}. Sin embargo, se necesitan las espectroscopías de EPR y Mössbauer para confirmar esta hipótesis.

Este trabajo, junto con el de Hirasawa y Tamura (1984), muestran la existencia de 1 FMN, 1 FAD y 1 agrupación sulfo-



férrica en la Fd-GOGAT (Tabla XXV). El hecho de que hasta ahora no se hayan visto dichos grupos en las Fd-GOGATs procedentes de otras fuentes biológicas se ha debido a que:

- 1) Las técnicas de purificación utilizadas han sido poco resolutivas, y no han partido del material adecuado para preparar suficiente cantidad de enzima pura que permita los estudios analíticos y espectroscópicos a quí mostrados.
- 2) Es posible la pérdida de grupos prostéticos durante la purificación de la enzima. Hirasawa y Tamura (1984) observaron que la Fd-GOGAT de hojas de espinaca se degradaba con pérdidas significativas de grupos prostéticos flavínicos durante electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, cuando el proceso se realizaba en condiciones de baja fuerza iónica y ausencia de 2-oxoglutarato. A esta observación hay que añadir, además, la posibilidad de que el centro sulfoférrico presente pueda sufrir daños irreversibles durante los tratamientos fisicoquímicos a los que hay que someter la enzima durante la purificación.

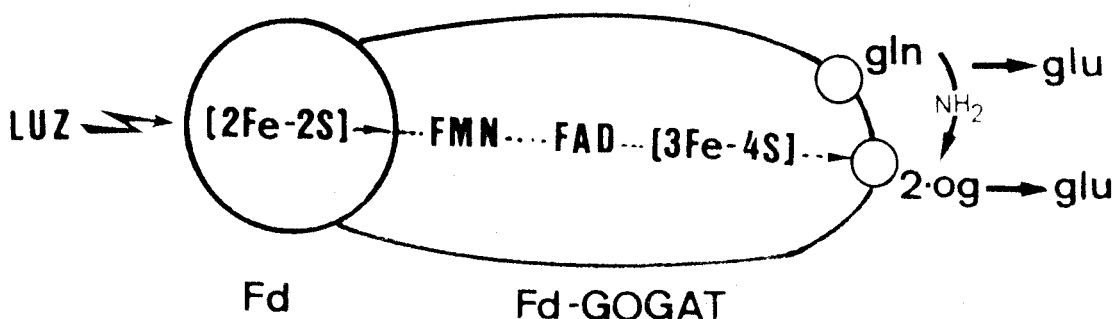
Es muy posible, por tanto, que el avance en el conocimiento de la Fd-GOGAT que supone este trabajo se deba en gran medida a la puesta a punto del método de purificación adecuado que nos ha permitido preparar cantidades suficientes de enzima puro y de buena calidad.

La composición observada para la Fd-GOGAT de *C.reinhardtii* y de espinaca es bastante similar a la de las NADPH-GOGATs de bacterias (Tabla XXIV, B), lo que nos hace pensar que las glutamatosintasas de organismos fotosintéticos y bacterias pueden tener un origen evolutivo común. En este contexto es importante señalar que el peso molecular de la Fd-GOGAT de organismos fotosintéticos es similar al de la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de bacterias (Tabla XXV y XXIV, B).

Los estudios hechos con inhibidores y los espectroscópicos, nos dan una información previa, pero importante, acerca del mecanismo de la reacción catalizada por la Fd-GOGAT. Aunque desconocemos la secuencia que siguen los electrones desde la ferredoxina reducida hasta el 2-oxoglutarato, sí podemos asegurar lo siguiente:

- a) La Fd-GOGAT posee una actividad 2-oxoglutarato reductasa dependiente de ferredoxina pero independiente de glutamina, en la que participan las flavinas y, probablemente, la agrupación sulfoférica.
- b) La azaserina, análogo de la glutamina, bloquea esta actividad oxidorreductasa de la Fd-GOGAT.
- c) En el mecanismo catalítico de la enzima participan radicales libres, como se pone de manifiesto mediante los estudios efectuados con la Fd-GOGAT durante el recambio catalítico o "turnover", indicando que las flavinas actúan a través de su forma semiquinónica. Esto es lógico ya que la ferredoxina es transportadora de un solo electrón. Una observación análoga se ha descrito para la Fd-GOGAT de espinaca (Hirasawa y Tamura, 1984).

La siguiente figura muestra un esquema, todavía hipotético, sobre el mecanismo de acción de la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*:



Para concluir, resulta interesante hacer un estudio comparativo de las dos proteínas con actividad glutamato sintasa encontradas en *C. reinhardtii* (Tablas XXIV y XXV respectivamente). Hay diferencias importantes entre ambas enzimas, como es el tamaño, siendo la NADH-GOGAT bastante mayor. Además, difieren en parámetros cinéticos, como es la  $K_m$  por 2-oxoglutarato, que es del orden de 100 veces superior en el caso de la Fd-GOGAT. Por otra parte, los indicios encontrados en la NADH-GOGAT, hacen suponer que esta proteína puede tener una composición en grupos prostéticos similar a la de la Fd-GOGAT.

## V. CONCLUSIONES

1. La utilización de amonio por diferentes estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii* es un proceso dependiente de la luz, que se lleva a cabo a velocidades comprendidas entre 10 y 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{chl}$ , a través de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). La estirpe 203 muestra un elevado consumo de amonio en presencia de MSX, conocido inhibidor de la glutamina sintetasa, lo que sugiere, para dicho organismo, la participación, en esas condiciones, de una ruta de incorporación de amonio alternativa a la GS-GOGAT.
2. Las células permeabilizadas y los extractos crudos de *Chlamydomonas* muestran actividad glutamato sintasa con NADH y metil viológeno ó ferredoxina reducidos, como donadores de electrones. Dichas actividades son absolutamente dependientes de la presencia de glutamina y 2-oxoglutarato como donador y aceptor, respectivamente, del grupo  $-\text{NH}_2$ , para la síntesis de glutamato. La estirpe silvestre 21 gr es la que muestra el nivel más elevado de actividad glutamato sintasa.
3. Durante el crecimiento autótrofo del alga, el nivel intracelular de la actividad Fd-GOGAT es mucho más alto que el de NADH-GOGAT. Mientras que el nivel de Fd-GOGAT es relativamente invariable, las células cultivadas en oscuridad con acetato como fuente de carbono, son las que presentan un mayor nivel de actividad NADH-GOGAT, y las cultivadas en la luz con ausencia de  $\text{CO}_2$ , las que tienen menor proporción de dicha enzima. Las células deficientes en nitrógeno asimilan el amonio a una velocidad 5 veces superior a la de las células normales, presentando un incremento muy significativo de la actividad GOGAT en un plazo de 24 h, sobre todo de aquella dependiente de NADH. Si a estas cé-

lulas se añade posteriormente amonio, el nivel intracelular de las glutamato sintasas aumenta, en un intervalo de tiempo de 7 h, volviendo después a los valores normales.

4. Mediante cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Sefacel se consiguen separar las actividades glutamato sintasa dependientes de ferredoxina y de NADH de este alga, indicando que ambas actividades van asociadas a dos enzimas diferentes. Dichas enzimas pueden usar también metil viológeno reducido, como donador de electrones, para la síntesis de glutamato.
  
5. La NADH-GOGAT se ha purificado 350 veces por un método que utiliza la cromatografía de afinidad con Cibacrón-Sefarosa. Se trata de un complejo enzimático que, además de la actividad fisiológica (NADH-GOGAT), muestra dos actividades adicionales, que pueden ser ensayadas por separado; una NADH-diaforasa, que utiliza ferricianuro como aceptor de electrones, y una MVH-GOGAT, que no puede utilizar bencil viológeno o flavinas como transportadores de electrones. La afinidad de la enzima por los sustratos fisiológicos (glutamina, 2-oxoglutarato y NADH) es significativamente superior a la que presenta por los sustratos artificiales (ferricianuro y metil viológeno). Azaserina ó 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, análogos estructurales de la glutamina, inhiben las actividades NADH- y MVH- GOGAT, pero no la actividad NADH-diaforasa del complejo. El *p*-hidroximercuribenzoato inhibe fuertemente todas las actividades del complejo NADH-GOGAT, siendo la NADH-diaforasa la más resistente a esta inhibición. Altas concentraciones de los sustratos NADH y 2-oxoglutarato inhiben fuertemente la enzima, que es bastante sensible a la degradación térmica, perdiendo sus actividades por

calentamiento a 45 °C durante 10 min. Esta enzima presenta un peso molecular de 368.000 y exhibe un espectro de absorción con picos u hombros a 275, 375, 420, 475 y 670 nm, indicativos de una flavoproteína sulfoférica. Cuando se añade NADH a la proteína oxidada, la absorbancia entre 400 y 500 nm disminuye, y se recupera al reoxidar la enzima con 2-oxoglutarato y glutamina, indicando que el grupo flavínico es funcional durante la catálisis enzimática.

6. La ferredoxina de *Chlamydomonas reinhardtii*, proteína sustrato de la Fd-GOGAT, ha sido purificada hasta homogeneidad electroforética por un procedimiento rápido y cómodo, mediante cromatografías de intercambio iónico, obteniendo elevados rendimientos. Se trata de una pequeña proteína de peso molecular 11.800, cuyo espectro de absorción muestra máximos a 276, 330, 420 y 460 nm, en la forma oxidada, con una relación de absorbancias  $A_{420}/A_{276}$  de 0,51. La ferredoxina reducida muestra un único pico a 276 nm, con hombros a 284, 310, 390, 469 y 537 nm, y señales de EPR, a la temperatura del helio líquido, con valores de  $g$  a 1,88, 1,96 y 2,05. La proteína contiene un centro {2Fe-2S} por molécula, con un potencial normal, a pH 7,5, de -410 mV, siendo capaz de actuar como transportadora de 1 electrón, y tratándose, por tanto, de una ferredoxina "tipo planta". La cadena polipeptídica de la ferredoxina consta de 99 aminoácidos que incluyen a todos los aminoácidos proteínogénicos, siendo la alanina y los aminoácidos ácidos los más abundantes, lo que justifica el carácter ácido de esta proteína, con un punto isoeléctrico de 3,30.
7. La Fd-GOGAT se ha purificado hasta homogeneidad electroforética por un método que incluye cromatografías en DEAE-Sefacel, hidroxilapatito y Fd-Sefarosa. La activi

dad de esta enzima puede ensayarse con ferredoxina o metil viológeno reducidos químicamente con ditionito, siendo inactiva con los piridín y flavín nucleótidos reducidos, mostrando una afinidad muy superior por la ferredoxina que por el metil viológeno. Azaserina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, verde de bromocresol y *p*-hidroximercuribenzoato son potentes inhibidores de la Fd-GOGAT, que es también sensible a inhibición por exceso de 2-oxoglutarato, y mantiene bien su actividad después de calentarla a 50 °C durante 10 min, perdiéndola si el calentamiento se hace por encima de los 60 °C.

Esta enzima está formada por una única cadena polipeptídica, de peso molecular 146.000, y, muestra, en la forma nativa, máximos de absorción a 278, 377 y 437 nm, con una relación de absorbancias  $A_{278}/A_{437}$  alrededor de 7, y un coeficiente de extinción a 437 nm de  $25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , indicativos de una flavoproteína sulfoférica. La adición de ditionito provoca la pérdida del pico a 437 nm. El grupo prostético flavínico, una vez extraído de la enzima, muestra máximos de absorción a 266, 355 y 447 nm, y emisión de fluorescencia característica a 530 nm cuando se le excita con luz de 450 nm. El análisis químico de esta proteína muestra la presencia de 1 mol de FAD, 1 FMN, 3 Fe y 4 S lábil por mol de enzima. La enzima oxidada muestra una señal de EPR a  $g = 2,03$ , que desaparece por encima de 6 °K. En condiciones reductoras (dithionito, solo o en la presencia de ferredoxina o metil viológeno), la enzima no es paramagnética, no mostrando señales de EPR. El análisis químico y de EPR de la proteína indican que ésta puede contener un centro {3Fe-4S}. Cuando se añade un exceso de 2-oxoglutarato a la enzima reducida, tanto la ferredoxina como el grupo prostético flavínico son reoxidados. La azaserina bloquea este flujo de electrones. Los estudios de EPR durante el recambio catalítico o "turnover" de la enzi



ma muestran la presencia de una señal a  $g = 2,00$ , indicando la formación de un radical flavínico semiquinónico durante la catálisis. Esta señal desaparece, cuando el poder reductor se extingue.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Adachi, K. y Suzuki, A. (1977). Purification and properties of glutamate synthase from *Thiobacillus thioparus*. *J. Bacteriol.* 129, 1173-1182
- Anderson, J.W. y Done, J. (1977). A polarographic study of glutamate synthase activity in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 60, 354-359
- Arima, Y. (1978). Glutamate synthase in rice root extracts and the relationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. *Plant Cell Physiol.* 19, 956-961
- Armstrong, J.J., Surzycki, S.J., Moll, B. y Levine, R.P. (1971). Genetic transcription and translation specifying chloroplasts components in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 10, 692-701
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: poliphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15
- Avila, C., Cánovas, F., Núñez de Castro, I. y Valpuesta, V. (1984). Separation of two forms of glutamate synthase in leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1125-1130
- Azuara, M.P. y Aparicio, P.J. (1984). Effects of light quality, CO<sub>2</sub> tensions and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations on the inorganic nitrogen metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 5, 97-103
- Beevers, L. y Storey, R. (1976). Glutamate synthase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 57, 862-866
- Beinert, H. y Thomson, A.J. (1983). Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 222, 333-361
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. y Grassl, M. (1974). Enzyme als biochemische reagentien. En *Methoden der enzymatischen analyse* (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 454-558, Verlag Chemie, Weinheim.

- Birmingham, B.C., Coleman, J.R. y Colman, B. (1982). Measurement of photorespiration in algae. *Plant Physiol.* 69, 259-262
- Boland, M.J. y Benny, A.G. (1977). Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. *Eur.J.Biochem.* 79, 355-362
- Buchanan, B.B. y Arnon, D.I. (1971). Ferredoxins from photosynthetic bacteria, algae and higher plants. *Methods Enzymol.* 23, 413-440
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brenchley, J.E., Prival, M.J. y Magasanik, B. (1973). Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J.Biol.Chem.* 248, 6122-6128
- Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.G., Andrew, P.W. y Rogers, L.J. (1977). Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins. *Biochem.J.* 168, 205-209
- Chiu, J.Y. y Shargool, P.D. (1979). Importance of glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 63, 409-415
- Cullimore, J.V. (1981). Glutamine synthetase of *Chlamydomonas*: rapid reversible deactivation. *Planta* 152, 587-591
- Cullimore, J.V. y Sims, A.P. (1981 a). Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20, 597-600
- Cullimore, J.V. y Sims, A.P. (1981 b). Pathway of ammonia assimilation in illuminated and darkened *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20, 933-940

- Dougall, D.K. (1974). Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 639-646
- Dutton, J.E. y Rogers, L.J. (1978). Isoelectric focusing of ferredoxins, flavodoxins and a rubredoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 537, 501-506
- Dutton, P.L. y Wilson, D.F. (1974). Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 165-212
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954
- Edmond, D., Rondeau, N. y Cedergreu, R.J. (1979). Distinctive properties of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Can. J. Biochem.* 57, 843-851
- Eisele, R. y Ullrich, W.R. (1977). Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH<sup>-</sup> flux in *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Physiol.* 59, 18-21
- Emes, M.J. y Fowler, M.J. (1979). The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta* 144, 249-253
- Everest, S.A. y Syrett, P.J. (1983). Evidence for the participation of glutamate dehydrogenase in ammonium assimilation by *Stichococcus bacillaris*. *New Phytol.* 93, 581-589
- Evstigneeva, Z.G., Gromyko, E.A. y Kretovich, U.L. (1974). *Biokhimiya* 39, 126-130
- Faeder, E.J. y Siegel, L.M. (1973). A rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixtures. *Anal. Biochem.* 53, 332-336

- Fernández, E. y Cárdenas, J. (1982). Regulation of the nitrate-reducing system enzymes in wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol.Gen.Genet.* 186, 164-169
- Florencio, F.J. y Vega, J.M. (1982). Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 21, 1195-1200
- Florencio, F.J. y Vega, J.M. (1983). Separation, purification and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z.Naturforsch.* 38, 531-538
- Geary, L.E. y Meister, A. (1977). On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate catalyzed by glutamate synthase. *J.Biol.Chem.* 252, 3501-3508
- Gorman, D.S. y Levine, R.P. (1966). Photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* V. Purification and properties of cytochrome 553 and ferredoxin. *Plant Physiology* 41, 1643-1647
- Gross, M., Cooper, A.J.L. y Meister, A. (1976). On the utilization of L-glutamine by glutamate dehydrogenase. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 70, 373-380
- Guiz, C., Hirel, B., Shedlofsky, G. y Gadal, P. (1979). Occurrence and influence of light on the relative proportions of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci.Lett.* 15, 271-277
- Hall, D.O., Rao, K.K. y Cammack, R. (1975). The iron-sulphur proteins: structure, function and evolution of a ubiquitous group of proteins. *Sci.Prog.Oxf.* 62, 285-317
- Harel, E., Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1977). The localisation of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta* 134, 195-200

Hase, T., Matsubara, H., Koike, H. y Kato, S. (1983). Amino acid sequence of ferredoxin from a thermophilic blue-green alga, *Synechococcus* sp. .Salt bridges responsible for their mostability. *Biochim.Biophys.Acta* 744, 46-52

Hedrick, J.L. y Smith, A.J. (1968). Size and charge isomer separation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch.Biochem.Biophys.* 126, 155-164

Hemmilä, I.A. y Mäntsälä, P.I. (1978). Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem.J.* 173, 45-52

Hewitt, E.J., Hucklesby, A.P. y Notton, B.A. (1976). Nitrate metabolism. En *Plant Biochemistry* (Bonner, J. y Varner, J.E., eds.), pp. 633-681, Academic Press, London.

Hirasawa, M. y Tamura, G. (1984). Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. *J.Biochem.* 95, 983-994

Hirel, B. y Gadat, P. (1981). Glutamine synthetase isoforms in pea leaves: intracellular localization. *Z.Pflanzenphysiol.* 102, 315-319

Huisman, J.G., Gebbink, M.G.Th., Modderman, P. y Stegwee, D. (1977). The coding site of chloroplast ferredoxin. *Planta* 137, 97-105

Huisman, J.G., Stapel, S. y Gebbink, M.G.Th. (1978). Characterization of ferredoxins on a nanomole scale. *Anal.Biochem.* 90, 501-509

Huisman, J.G., Touw, I., Liebrechts, P. y Bernards, A. (1979). Biosynthesis of ferredoxin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 145, 351-356

- Hummelt, G. y Mora, J. (1980). Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1688-1694
- Hutner, S.H., Provosoli, L., Schatz, A. y Haskins, C.P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Amer. Phil. Soc.* 94, 152-170
- Hutson, K.G.; Rogers, L.J., Haslett, B.G., Boulter, D. y Cammack, R. (1978). Comparative studies on two ferredoxins from the cyanobacterium *Nostoc* strain MAC. *Biochem. J.* 172, 465-477
- Ida, S. (1977). Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by Ferredoxin-Sepharose affinity chromatography. *J. Biochem.* 82, 915-918
- Johansson, B.C. y Gest, H. (1977). Adenylation-deadenylation control of the glutamine synthetase of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 81, 365-371
- Jovin, T., Charamback, A. y Naughton, M.A. (1964). Apparatus for preparative temperature regulated polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 9, 351-364
- Kang, S. y Titus, J.S. (1981). Isolation and characterization of glutamate synthase in the apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106, 765-768
- Ke, B., Bulen, W.A., Shaw, E.R. y Breeze, R.H. (1974). Determination of oxidation-reduction potentials by spectropolarimetric titration. Application to several iron-sulfur proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 301-309
- Khanna, S. y Nicholas, D.J.D. (1983). Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* 134, 98-103



- King, T.E. y Morris, R.O. (1967). Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. *Methods Enzymol.* 10, 634-641
- Koziol, J. (1971). Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes. *Methods Enzymol.* 18, 253-285
- Kretovich, W.L., Evstigneeva, Z.G., Pushkin, A.V. y Dzhokharidze, T.Z. (1981). Two forms of glutamine synthetase in leaves of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry* 20, 625-629
- Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251, 614-616
- Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1975). The occurrence of glutamate synthase in algae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 856-862
- Lea, P.J., Mills, W.R., Wallsgrave, R.M. y Mifflin, B.J. (1982). Assimilation of nitrogen and synthesis of amino acids in chloroplasts and cyanobacteria. En *On the origins of chloroplasts* (Schiff, J.A., ed.), pp. 149-178, Elsevier, New York.
- Losada, M., Guerrero, M.G. y Vega, J.M. (1981). The assimilatory reduction of nitrate. En *Biology of inorganic nitrogen and sulfur* (Bothe, H. y Trebst, A., eds.), pp. 30-63, Springer-Verlag, Berlin.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Lück, H. (1963). Catalase. En *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 885-894, Academic Press, New York
- Mann, A.F., Fentem, P.A., Stewart, G.R. (1979). Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 515-521

- Manzano, C., Candau, P. y Guerrero, M.G. (1978). Affinity chromatography of *Anacystis nidulans* ferredoxin-nitrate reductase and NADP<sup>+</sup> reductase on reduced Ferredoxin-Sepharose. *Anal. Biochem.* 90, 408-412
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379
- Massey, V. (1957). Studies on succinic dehydrogenase: valency state of the iron in beef heart succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 229, 763-770
- Match, T. y Takahashi, E. (1981). Glutamate synthase in greening pea shoots. *Plant Cell Physiol.* 22, 727-731
- Match, T. y Takahashi, E. (1982). Changes in the activities of ferredoxin- and NADH- glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* 154, 289-294
- Match, T., Suzuki, F. y Ida, S. (1979 a). Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 20, 1329-1340
- Match, T., Takahashi, E. y Ida, S. (1979 b). Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes. *Plant Cell Physiol.* 20, 1455-1459
- Match, T., Ida, S. y Takahashi, E. (1980 a). A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase. *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 43, 1-6
- Match, T., Ida, S. y Takahashi, E. (1980 b). Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* 21, 1461-1474

Matsubara, H. (1968). Purification and some properties of *Scenedesmus* ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 243, 370-375

Matsubara, H., Hase, T., Wakabayashi, S. y Wada, K. (1978). Gene duplication during resolution of chloroplast-type ferredoxins. En *Evolution of Protein Molecules* (Matsubara, H. y Yamanaka, T., eds.), pp. 209-220, Japan Sci.Soc. Press, Tokio

Maurer, H.R. (1971). Gel isoelectric focusing. En *Disc Electrophoresis of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, pp. 132-136, Walter de Gruyter, Berlin

McKenzie, G.H., Ching, A.L. y Gayler, K.R. (1979). Glutamine synthetase/glutamine: $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase in chloroplasts from the marine algae *Caulerpa simpliciuscula*. *Plant Physiol.* 63, 578-582

Meers, J.L., Tempest, D.W. y Brown, C.M. (1970). Glutamine (amide):2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP<sup>+</sup>), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-194

Mifflin, B.J. y Lea, P.J. (1977). Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329

Mifflin, B.J., Lea, P.J. y Wallsgrove, R.M. (1980). The role of glutamine in ammonia assimilation and reassimilation in plants. En *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.), pp. 213-234, Academic Press, New York.

Mifflin, B.J., Wallsgrove, R.M. y Lea, P.J. (1981). Glutamine metabolism in higher plants. *Current topics in cell regulation* 20, 1-43

Miller, R.E. y Stadtman, E.R. (1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 247, 7409-7417

- Mitsui, A. (1971). Purification and some chemical properties of crystalline *Euglena ferredoxin*. *Biochim. Biophys. Acta* 243, 447-456
- Miyatake, K. y Kitaoka, S. (1981). NADH-dependent glutamate synthase in *Euglena gracilis* z. . *Agric. Biol. Chem.* 45, 1727-1729
- Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Cárdenas, J. y Castillo, F. (1983). Ammonia assimilation pathways in *Rhodospseudomonas capsulata* E<sub>1</sub>F<sub>1</sub>. *Arch. Microbiol.* 136, 147-151
- Orme-Johnson, W.H. y Orme-Johnson, N.R. (1982). Iron-sulfur proteins: the problem of determining cluster type. En *Iron-sulfur proteins* (Spiro, T.G., ed.), pp. 67-95, Wiley-Interscience, New York.
- Paone, D.A.M. y Stevens, S.E.Jr. (1981). Nitrogen starvation and the regulation of glutamine synthetase in *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant Physiol.* 67, 1097-1100
- Pharmacia Fine Chemicals (1979). Blue-Sepharose CL-6B. En *Affinity Chromatography. Principles and Methods* (Pharmacia fine chemicals, ed.), Uppsala
- Pishak, M.R. y Phillips, A.T. (1979). A modified assay for measuring glutamine synthetase in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 94, 82-88
- Rajagopalan, K.V. y Handler, P. (1964). The absorption spectra of iron-flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 239, 1509-1514
- Rathnam, C.K.M. y Edwards, G.E. (1976). Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll protoplasts and bundle sheath cells in leaves of three groups of C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.* 57, 881-885

- Rhodes, D., Rendon, G.A. y Stewart, G.R. (1975). The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* 125, 201-211
- Rhodes, D., Rendon, G.A. y Stewart, G.R. (1976). The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta* 129, 203-210
- Rideal, E.K. y Roberts, R. (1951). The photochemistry of native proteins. *Proc.R.Soc.Lond.Ser.A.* 205, 391-408
- Rigano, C., Di Martino Rigano, V., Vona, V. y Fuggi, A. (1981). Nitrate reductase and glutamine synthetase activities, nitrate and ammonia assimilation, in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Arch.Microbiol.* 129, 110-114
- Roon, R.J., Even, H.L. y Larimore, F. (1974). Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 118, 89-95
- Schachman, H.K. (1957). Ultracentrifugation, diffusion and viscometry. *Methods Enzymol.* 4, 32-103
- Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1970). Glutamine synthetase (*E.coli*). *Methods Enzymol.* 17, 910-922
- Shin, M. y Oshino, R. (1978). Ferredoxin-Sepharose 4B as a tool for the purification of ferredoxin-NADP reductase. *J. Biochem.* 83, 357-361
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductans. *Biochim.Biophys.Acta* 112, 346-362

- Siegel, L.M., Murphy, M.J. y Kamin, H. (1973). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. *J. Biol. Chem.* 248, 251-264
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Ocean Limnol. Oceanogr.* 14, 799-801
- Stewart, G.R., Mann, A.F., y Fentem, P.A. (1980). Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En *The Biochemistry of Plants* (Mifflin, B.J., ed.), Vol. 5, pp. 271-327, Academic Press, New York.
- Storey, R. y Reporter, M. (1978). Amino acid metabolism in developing soybeans (*Glycine max*): glutamate synthase in the cotyledons. *Can. J. Bot.* 56, 1349-1356
- Sueoka, N., Chiang, K.S. y Kates, J.R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* 25, 47-66
- Suzuki, A. y Gadal, P. (1982). Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.* 69, 848-852
- Suzuki, A., Vidal, J. y Gadal, P. (1982). Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. *Plant Physiol.* 70, 827-832
- Sweeney, W.V. y Rabinowitz, J.C. (1980). Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 139-161
- Syrett, P.J. y Hipkin, C.R. (1973). The appearance of nitrate reductase activity in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 111, 57-64

- Syrett, P.J. y Leftley, J.W. (1976). Nitrate and urea assimilation by alga. En *Perspectives in Experimental Biology* (Sunderland, N., ed.), Vol. 2, pp. 221-234, Pergamon Press, Oxford and New York
- Tagawa, K. y Arnon, D.I. (1962). Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature* 195, 537-543
- Tagawa, K. y Arnon, D.I. (1968). Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 153, 602-613
- Takahashi, Y., Hase, T., Wada, K. y Matsubara, H. (1981). The second ferredoxin from spinach leaf. *J. Biochem.* 90, 1825-1828
- Takahashi, Y., Hase, T., Wada, K. y Matsubara, H. (1983). Ferredoxins in developing spinach cotyledons: the presence of two molecular species. *Plant Cell Physiol.* 24, 188-198
- Tamura, G., Oto, M., Hirasawa, M. y Aketagawa, J. (1980). Isolation and partial characterization of homogeneous glutamate synthase from *Spinacia oleracea*. *Plant Sci. Lett.* 19, 209-215
- Tempest, D.W., Meers, J.L. y Brown, C.M. (1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117, 405-407
- Thacker, A. y Syrett, P. J. (1972). The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 71, 423-433
- Thauer, R., Schirrmacher, H., Schymanski, W. y Schönheit, P. (1978). A rapid procedure for the purification of ferredoxin from spinach using polyethyleneimine. *Z. Naturforsch.* 33, 495-497

Thomas, R.J., Hipkin, C.R. y Syrett, P.J. (1976). The interaction of nitrogen with photosynthesis in nitrogen deficient cell of *Chlorella*. *Planta* 133, 9-13

Thornber, J.P. y Olson, J.M. (1967). The chemical composition of a crystalline bacteriochlorophyll-protein complex isolated from the green bacterium *Chloropseudomonas ethylicum*. *Biochemistry* 7, 2242-2249

Tischner, R. y Schmidt, A. (1982). A thioredoxin mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 70, 113-116

Trotta, P.P., Platzer, K.E.B., Haschemeyer, R.H. y Meister, A. (1974). Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amido transferase. *Proc.Ntl.Acad.Sci.USA* 71, 4607-4611

Tuli, R. y Thomas, J. (1981). *In vivo* regulation of glutamine synthetase by ammonium in the cyanobacterium *Anabaena* L-31. *Arch.Biochem.Biophys.* 206, 181-189

Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann.Rev.Biochem.* 47, 1127-1162

Wallsgrave, R.M. y Mifflin, B.J. (1977). Ferredoxin-Sepharose as an affinity absorbent for the purification of glutamate synthase and other ferredoxin-dependent enzymes. *Biochem.Soc.Trans.* 5, 269-271

Wallsgrave, R.M., Harel, E., Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1977). Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J.Exp.Bot.* 28, 588-596

Wallsgrave R.M., Lea, P.J., Mifflin, B.J. (1979). Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* 63, 232-236



- Wallsgrave, R.M., Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1982). The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154, 473-476
- Wang, C. y Raper, J.R. (1970). Isozyme patterns and sexual morphogenesis in *Schizophyllum*. *Proc.Ntl.Acad.Sci.USA* 66, 882-889
- Washitani, I. y Sato, S. (1978). Studies on the function of proplastids in the metabolism of *in vitro* cultured tobacco cells V. Primary transamination. *Plant Cell Physiol.* 19, 43-50
- Weber, K. y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.* 244, 4406-4412
- Wickramasinghe, R.H. (1974). Adrenodoxin, ferredoxins and other iron-sulfur (non heme iron proteins) part II. *Enzyme* 17, 227-264
- Wickramasinghe, R.H. y McIntosh, E.N. (1974). Adrenodoxin, ferredoxins and other iron-sulfur (non heme iron proteins) part I. *Enzyme* 17, 210-226
- Winter, H.C., Powell, G.K. y Dekker, E.E. (1982). Glutamine synthetase of germinating peanuts. *Plant Physiol.* 69, 41-47
- Xavier, A.V., Moura, J.G. y Moura, I. (1981). Novel structures in iron-sulfur proteins. *Structure and Bonding* 43, 187-213
- Yelton, M.M. y Yoch, D.C. (1981). Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*: characterization of glutamate synthase. *J.Gen.Microbiol.* 123, 335-342

Zumft, W.C. (1981). The biochemistry of dinitrogen fixation. En *Biology of Inorganic nitrogen and sulfur* (Bothe, H. y Trebst, A., eds.), pp. 116-130, Springer-Verlag, Berlin

Antonio José Márquez Cateza  
" Biosíntesis de glutamato en Chlamydomonas  
reubardii. Purificación y propiedades de las enzimas  
mas con actividad glutamato sintasa "

10

Museo

95

*[Handwritten signature]*

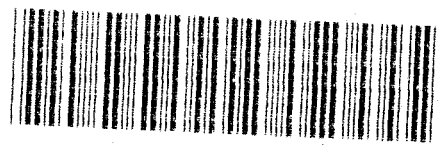
*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

R. Colonna

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



500293231  
P61 E TO-110

293231