

TS  
612

R. 6632



ESTUDIOS SOBRE LA VIA DE ASIMILACION DE AMONIO EN  
CIANOBACTERIAS. GLUTAMATO SINTASA Y GLUTAMINA SINTETASA  
DE Synechococcus 6301

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en  
Biología por la Licenciada Silvia Marqués Martín



Sevilla, Junio de 1988

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio...136...número...58...del libro  
correspondiente. 14 JUN. 1988  
Sevilla, \_\_\_\_\_  
El Jefe del Negociado de Tesis,

DIRECTOR:

Pedro Candau Chacón

Dr. Pedro Candau Chacón

A mis padres

## INDICE

Abreviaturas .....	1
<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
I.A. GLUTAMATO SINTASA .....	7
I.B. GLUTAMINA SINTETASA DE CIANOBACTERIAS .....	11
<b>II. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>17</b>
II.A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	18
II.A.1. Organismos empleados .....	18
II.A.2. Condiciones de cultivo .....	18
II.A.2.1. Condiciones estándar de cultivo .....	18
II.A.2.2. Condiciones especiales de cultivo .....	20
II.A.3. Recogida de células .....	20
II.B. PREPARACIONES .....	20
II.B.1. Preparaciones de extractos celulares .....	20
II.B.2. Otros métodos de rotura .....	21
II.B.2.1. Prensa de French .....	21
II.B.2.2. Homogeneizador por vibración "Bühler" .....	21
II.B.2.3. Choque hipotónico de esferoplastos obtenidos por tratamiento con lisozima .....	22
II.B.3. Purificación de ferredoxina .....	22
II.B.4. Preparación de gel de ferredoxina sefarosa .....	23
II.B.5. Obtención de antisuero de conejo anti-GS .....	24
II.C. ENSAYOS ENZIMATICOS .....	25
II.C.1. Ensayos de la actividad glutamato sintasa .....	25
II.C.1.1. Ensayo <u>in situ</u> de la actividad glutamato sin- tasa .....	25
II.C.1.2. Ensayo <u>in vitro</u> de la actividad glutamato sin- tasa .....	26
II.C.2. Ensayo <u>in situ</u> de la actividad glutamina sintetasa. .....	26
II.C.2.1. Determinación de la actividad transferasa ....	26
II.C.2.2. Determinación de la actividad biosintética ...	27
II.C.3. Ensayo de la actividad glutamato deshidrogenasa ...	27
II.C.3.1. Ensayo <u>in vitro</u> de la actividad glutamato des- drogenasa .....	27

II.C.3.2. Ensayo <u>in situ</u> de la actividad glutamato des- hidrogenasa .....	28
II.C.4. Ensayo de otras enzimas .....	28
II.C.4.1. Ensayo de la actividad alcohol deshidrogenasa.	28
II.C.4.2. Ensayo de la actividad catalasa .....	29
II.C.4.3. Ensayo de la actividad glucosa-6-fosfato des- hidrogenasa .....	29
II.C.4.4. Ensayo de la actividad ferredoxina-NADP reduc- tasa .....	29
II.C.4.5. Ensayo de la actividad nitrato reductasa .....	30
II.D. METODOS ANALITICOS .....	30
II.D.1. Separación y determinación de glutamato y glutamato mediante HPLC .....	30
II.D.1.1. Descripción del cromatógrafo .....	30
II.D.1.2. Derivatización de los aminoácidos .....	31
II.D.1.3. Desarrollo de la cromatografía .....	32
II.D.2. Análisis de flavinas .....	32
II.D.2.1. Extracción de las flavinas .....	32
II.D.2.1.1. Extracción por preincubación a 100°C .....	33
II.D.2.1.2. Extracción por hidrólisis ácida a 100°C .	33
II.D.2.1.3. Extracción por hidrólisis con TCA en frío	33
II.D.2.2. Análisis de flavinas por HPLC .....	33
II.D.3. Determinación de la composición de aminoácidos .....	34
II.D.4. Determinación de clorofila .....	35
II.D.5. Determinación de proteína .....	36
II.D.6. Determinación de $\gamma$ -glutamil hidroxamato .....	36
II.D.7. Determinación de nitrito .....	37
II.D.8. Determinación de parámetros físicos .....	37
II.D.8.1. Cálculo de densidad .....	37
II.D.8.2. Cálculo de viscosidad dinámica .....	37
II.E. TECNICAS EXPERIMENTALES .....	37
II.E.1. Centrifugaciones .....	37
II.E.2. Centrifugación en gradiente de sacarosa. Determina- ción del coeficiente de sedimentación .....	38
II.E.3. Cromatografías en columna .....	39
II.E.3.1. Cromatografía de intercambio iónico .....	39
II.E.3.2. Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxi- na-sefarosa .....	40

II.E.3.3. Cromatografía de filtración en gel. Determinación de radio de Stokes y peso molecular .....	40
II.E.4. Electroforesis .....	42
II.E.4.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida .....	42
II.E.4.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico ....	43
II.E.4.3. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida	45
II.E.4.4. Tinción de actividad glutamato sintasa en geles de poliacrilamida .....	45
II.E.4.5. Inmunolectroforesis en presencia de detergente .....	45
II.E.5. Determinación de absorbancia y espectros de absorción .....	46
II.E.6. Concentración de glutamato sintasa .....	46
II.E.6.1. Ultrafiltración .....	46
II.E.6.2. Concentración por diálisis .....	47
II.E.7. Eliminación de sales y moléculas pequeñas .....	47
II.E.8. Medida de pH .....	48
II.F. REACTIVOS .....	48
II.F.1. Procedencia de compuestos químicos y bioquímicos ..	48
III. <u>RESULTADOS</u> .....	50
III.A. DETERMINACION DE ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACION DEL AMONIO EN CIANOBACTERIAS, <u>in situ</u> E <u>in vitro</u> , MEDIANTE HPLC .....	51
III.A.1. Glutamato sintasa (GOGAT) .....	56
III.A.2. Glutamina sintetasa (GS) .....	59
III.A.3. Glutamato deshidrogenasa (GDH) .....	62
III.B. ESTUDIOS SOBRE LA GLUTAMATO SINTASA DE <u>Synechococcus</u> 6301 .....	64
III.B.1. Estudios sobre la actividad glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 realizados <u>in situ</u> .....	64
III.B.1.1. Caracterización de la actividad glutamato sintasa .....	64
III.B.1.2. Donadores de electrones de la glutamato sintasa ensayada <u>in vitro</u> .....	67
III.B.1.3. Localización intracelular de la glutamato sintasa de <u>Synechochoccus</u> 6301 .....	71

III.B.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad glutamato sintasa .....	73
III.B.1.5. Estudios cinéticos sobre la glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 realizados <u>in situ</u> ...	73
III.B.1.5.1. Efecto de pH y temperatura de ensayo sobre la actividad glutamato sintasa determinada <u>in situ</u> .....	75
III.B.1.5.2. Parámetros cinéticos de la glutamato sintasa determinados <u>in situ</u> .....	75
III.B.2. Purificación de la glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 .....	79
III.B.2.1. Método de purificación .....	79
III.B.2.1.1. Precipitación fraccionada con etanol del 40 al 70% .....	85
III.B.2.1.2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa .....	87
III.B.2.1.3. Cromatografía de afinidad en gel de ferrredoxina-sefarosa .....	90
III.B.2.2. Criterios de homogeneidad .....	94
III.B.2.2.1. Constancia de la actividad específica ..	94
III.B.2.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	98
III.B.2.2.2.1. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes .....	98
III.B.2.2.2.2. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes .....	100
III.B.3. Propiedades de la glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 .....	103
III.B.3.1. Propiedades fisicoquímicas .....	103
III.B.3.1.1. Coeficiente de sedimentación .....	103
III.B.3.1.2. Radio de Stokes .....	103
III.B.3.1.3. Peso molecular determinado en condiciones no desnaturalizantes .....	106
III.B.3.1.4. Peso molecular determinado en condiciones desnaturalizantes. Estimación del número de subunidades .....	108
III.B.3.1.5. Determinación de la fricción relativa ..	109
III.B.3.1.6. Espectros de absorción .....	111

III.B.3.1.7. Identificación y cuantificación del grupo prostético flavínico .....	114
III.B.3.1.8. Composición de aminoácidos de la glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 .....	117
III.B.3.2. Estudios catalíticos y cinéticos de la glutamato sintasa de <u>Synechococcus</u> 6301 .....	117
III.B.3.2.1. Donadores de electrones .....	117
III.B.3.2.2. Parámetros cinéticos de la glutamato sintasa purificada de <u>Synechococcus</u> 6301	121
III.B.3.2.2.1. Valores de las constantes de Michaelis (Km) para los distintos sustratos de la glutamato sintasa .	121
III.B.3.2.2.2. Efecto de temperatura y pH en el ensayo de la glutamato sintasa purificada de <u>Synechococcus</u> 6301 ....	125
III.B.3.2.2.3. Cinética de la actividad glutamato sintasa purificada .....	125
III.B.3.2.3. Efecto del tratamiento con inhibidores sobre la actividad glutamato sintasa ...	128
III.B.3.2.3.1. Efecto de la presencia de inhibidores en el ensayo .....	129
III.B.3.2.3.2. Efecto de algunos agentes modificadores de grupos funcionales sobre la glutamato sintasa .....	131
III.C. EFECTO DE TRANSICIONES LUZ-OSCURIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE <u>Synechococcus</u> 6301 ....	131
III.C.1. Inactivación por condiciones de oscuridad .....	133
III.C.1.1. Cinética de inactivación .....	133
III.C.1.2. Efecto de la fase de crecimiento del cultivo sobre el fenómeno de inactivación .....	135
III.C.1.3. Estudio inmunológico de la inactivación .....	137
III.C.1.4. Efecto de inhibidores de síntesis proteica sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad .....	140
III.C.1.5. Efecto de inhibidores de fotosíntesis sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad .....	143
III.C.2. Reactivación por luz de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad .....	147

III.C.2.1. Cinética de la reactivación de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad .....	147
III.C.2.2. Efecto de inhibidores sobre la reactivación por luz de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad .....	147
III.C.2.3. Efecto del tratamiento <u>in vitro</u> con ditiolos y tiorredoxina sobre la glutamina sintetasa inactivada <u>in vivo</u> por oscuridad .....	149
IV. <u>DISCUSION</u> .....	155
IV.A. DETERMINACION DE ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACION DEL AMONIO EN CIANOBACTERIAS, <u>in situ</u> E <u>in vitro</u> , MEDIANTE HPLC.....	156
IV.B. ESTUDIOS SOBRE LA GLUTAMATO SINTASA DE <u>Synechococcus</u> 6301 .....	161
IV.C. REGULACION POR LUZ-OSCURIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <u>Synechococcus</u> 6301 .....	175
V. <u>CONCLUSIONES</u> .....	185
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	188



## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALD	Aldolasa
AOA	Aminooxiacetato
APS	Adenosina-5'-fosfosulfato
BSA	Seroalbúmina bovina
BV	Bencilviológeno
CAF	Cloranfenicol
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenil-hidrazona
$\alpha$ -CGA	$\alpha$ -cetoglutarato (2-oxoglutarato)
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DEAE	Dietilaminoetil
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucina
DTE	Ditioeritritol
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato), sal sódica
DTT	Ditiotreititol
EDTA	Etilendiaminotetraacético
Fd	Ferredoxina
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	N-2-hidroxi-etilpiperacina-N'-2-etanosulfonato
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
kDa	Kilodalton
LEM	Light effect mediator
min.	Minuto
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio

MV	Metilviológeno
OPA	o-ftaldialdehido
PAPS	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
psi	libra por pulgada cuadrada
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
RIF	Rifampicina
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Acido tricloracético
Td	Tiorredoxina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

## I. INTRODUCCION

Las cianobacterias constituyen un amplio grupo de procariotas fotoautotrofos caracterizados por su capacidad para llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la de algas verdes y plantas superiores (153, 175).

El poder asimilatorio (ATP y poder reductor) generado a partir de la energía luminosa se utiliza en la asimilación fotosintética de carbono, nitrógeno, azufre y otros compuestos. La fijación de anhídrido carbónico tiene lugar fundamentalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, al igual que ocurre en los cloroplastos de plantas superiores (72, 115). Aunque las cianobacterias poseen las enzimas glucolíticas y la mayoría de las del ciclo de Krebs, parece que estas rutas no operan con carácter catabólico sino que desempeñan funciones biosintéticas, ya que estos organismos presentan la peculiaridad de carecer del complejo enzimático de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y de succinil-CoA sintasa, quedando, por tanto, el ciclo del ácido cítrico incompleto tras la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato (149). Este ácido orgánico es fundamental como precursor, entre otros compuestos, de los aminoácidos de la familia del glutamato, siendo sustrato de la glutamato sintasa, principal vía de síntesis de este aminoácido.

El catabolismo de azúcares ocurre, como consecuencia de la funcionalidad parcial de glucolisis y ciclo de Krebs, a través del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (116).

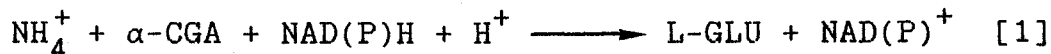
Las fuentes de nitrógeno más ampliamente utilizadas por las cianobacterias son nitrato y amonio, aunque un considerable número de estirpes presenta la capacidad adicional de fijar nitrógeno atmosférico. En general, la conversión de nitrógeno inorgánico en orgánico conlleva la entrada de la fuente nitrogenada en la célula, su reducción hasta el nivel de amonio, y la posterior incorporación de éste a esqueletos carbonados. El proceso total requiere 10 electrones por mol de nitrógeno asimilado cuando la fuente es nitrato, de los cuales dos electrones se gastan en la reducción aminante de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato.

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos

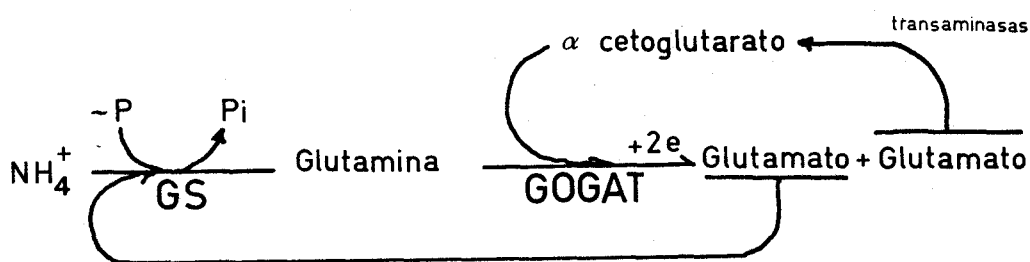
tipos fundamentales de cianobacterias: unicelulares, englobadas en las secciones I y II, según carezcan o no de la capacidad de formar endosporas, y filamentosas (secciones III, IV y V). En estas últimas, las células se presentan agrupadas formando tricomas (153). A partir de los tricomas de los dos últimos grupos se pueden diferenciar, creciendo en dinitrógeno, unas células especializadas en la fijación de nitrógeno: los heterocistos, que suministran un ambiente sin oxígeno necesario para que sea estable la nitrogenasa.

Las estirpes empleadas en este trabajo, Synechococcus 6301 y Synechocystis 6803, son cianobacterias unicelulares pertenecientes a la sección I que pueden utilizar para su crecimiento tanto nitrato como amonio, pero son incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico (80, 127).

Se han descrito dos rutas principales para la incorporación de amonio a esqueletos carbonados (154). Una de ellas implica una sola reacción, llevada a cabo por la enzima glutamato deshidrogenasa :



Esta actividad ha sido considerada durante mucho tiempo como la principal vía implicada en la incorporación de amonio en todos los organismos capaces de asimilar este compuesto. La otra ruta supone dos reacciones acopladas, llevadas a cabo por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (ruta GS-GOGAT). En este proceso, el nitrógeno del amonio es incorporado inicialmente como grupo amido de la glutamina, siendo después transferido al  $\alpha$ -cetoglutarato en la posición  $\alpha$ . La secuencia de reacciones requiere una molécula de ATP y dos equivalentes de poder reductor para la formación neta de una unidad de glutamato a partir de amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato. Los aspectos más relevantes del proceso se resumen en el siguiente esquema:



Sea cual fuere el modo de obtención primaria del amonio intracelular, (reducción de dinitrógeno, reducción de nitrato o entrada de amonio directamente), su incorporación posterior a esqueletos carbonados se realiza en cianobacterias a través de la ruta formada por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa. Las evidencias experimentales que apoyan esta conclusión son muchas. Los resultados del grupo de Wolk en cianobacterias fijadoras de nitrógeno (104, 105, 161, 176) demuestran, empleando el radioisótopo  $^{13}\text{N}$  e inhibidores de las enzimas implicadas, que en tiempos muy cortos de incubación, la radiactividad del  $^{13}\text{NH}_4^+$ , ya sea suplementado de forma exógena o resultante de la reducción de  $^{13}\text{N}_2$ , aparece primero en el grupo amido de la glutamina y posteriormente en el grupo  $\alpha$ -amino del glutamato. Por su parte, el inhibidor de glutamina sintetasa MSX impide la síntesis de glutamina, evitando la incorporación de  $^{13}\text{N}$  en aminoácidos. Del mismo modo, en presencia de azaserina, inhibidor de glutamato sintasa, la síntesis de  $^{13}\text{N}$ -glutamato se reduce unas cien veces, no afectando apenas a la formación de  $^{13}\text{N}$ -glutamina. Los trabajos del grupo de Stewart con  $^{15}\text{N}$  y con inhibidores de la ruta conducen a resultados similares (131, 155).

Este es el caso general, pero se presentan excepciones. El mismo tipo de experimentos, realizados con la cianobacteria no fijadora Synechococcus leopoliensis UTEX 625 (anteriormente denominada Anacystis nidulans) han llevado al grupo de Wolk a proponer que en este organismo unicelular, una parte sustancial del glutamato se forma por actividad de una glutamato deshidrogenasa (reacción [1]), y no por el sistema GS/GOGAT (104). Sin embargo, hasta ahora ha sido imposible detectar esta actividad en Synechococcus 6301 (67, 124), aunque se ha descrito y purificado en Synechocystis 6803 (41), si bien su operatividad en la asimilación primaria de amonio en este organismo no ha sido demostrada.

La determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos según las condiciones de cultivo, así como el efecto que sobre ellos tienen distintos inhibidores de las enzimas de la ruta han llevado a la conclusión (44) de que en Synechococcus

6301, la vía GS/GOGAT representa también el principal modo de asimilación de amonio. Estudios similares con otras especies de cianobacterias indican el funcionamiento de la ruta GS/GOGAT tanto en células cultivadas con nitrato como con dinitrógeno o amonio (44).

Basándonos en estos resultados, parece poderse generalizar que en cianobacterias, independientemente de la fuente de nitrógeno empleada para el crecimiento, la vía principal de asimilación de nitrógeno es la formada por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa.

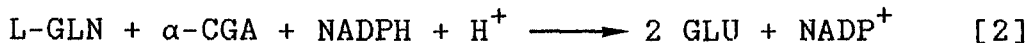
El glutamato formado de este modo debe a su vez donar el grupo amino a otros esqueletos carbonados en reacciones catalizadas por transaminasas, para originar los restantes aminoácidos (ver esquema). El nitrógeno del grupo amido de la glutamina puede ser transferido directamente al grupo no amino de los aminoácidos asparragina, histidina, arginina y triptófano (85).

La actividad alanina deshidrogenasa es una tercera posibilidad de incorporación de amonio a esqueletos carbonados. Su presencia en cianobacterias está bien documentada (44, 85, 133), aunque su implicación en la asimilación primaria de amonio es aún objeto de controversia.

Nuestro trabajo se ha centrado en completar los conocimientos existentes sobre la vía de incorporación de amonio a esqueletos carbonados en cianobacterias. Por una parte hemos iniciado el estudio bioquímico de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 y por otra hemos avanzado en el conocimiento de la fisiología de la regulación de su glutamina sintetasa.

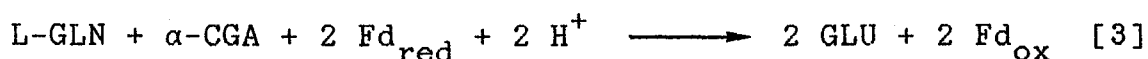
#### I.A. GLUTAMATO SINTASA

La enzima glutamato sintasa fue detectada por primera vez en 1970 por Tempest, Meers y Brown (160) en Aerobacter aerogenes por su capacidad para catalizar la transferencia reductiva, dependiente de NADPH, del grupo amido de la glutamina al  $\alpha$ -cetoglutarato, originando glutamato, según la siguiente reacción:



Esta enzima se denominó inicialmente glutamina (amido)- $\alpha$ -cetoglutarato aminotransferasa (GOGAT), o abreviadamente glutamato sintasa. La Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B.) la denominó L-glutamato:NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa (transaminante) (EC 1.4.1.13).

Desde este primer trabajo, se ha puesto de manifiesto su existencia en gran número de organismos. Sin embargo, su presencia en plantas superiores fue puesta en duda hasta 1974, año en que Lea y Mifflin identificaron en hojas de plantas superiores una enzima diferente capaz de catalizar la misma reacción de síntesis de glutamato pero utilizando ferredoxina reducida en vez de NADPH como fuente de poder reductor (82):



Simultáneamente, fue detectada también una glutamato sintasa dependiente de piridín nucleótidos en tejidos no fotosintéticos de plantas superiores (36, 45).

Actualmente se sabe que las glutamato sintasas están ampliamente distribuidas en la escala biológica, variando en los diferentes organismos el donador de electrones por el cual es específica, NADPH, NADH, NAD(P)H o ferredoxina.

La información existente sobre estas proteínas es escasa en comparación con la disponible sobre otras enzimas relacionadas con la asimilación de nitrógeno, y en particular sobre la glutamina sintetasa. Ello puede ser debido, entre otras razones, a la dificultad para encontrar un método reproducible y rápido de medirla.

La glutamato sintasa dependiente de piridín nucleótidos está presente tanto en organismos no fotosintéticos como en fotosintéticos, procariotas y eucariotas. 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, siendo más activa con NADH que con NADPH (154).

La NADPH-glutamato sintasa ha sido caracterizada en



bacterias no fotosintéticas tras su purificación por técnicas convencionales (1, 48, 61, 103, 106, 125, 140), y se ha abordado su purificación y caracterización en algunos procariontes fotosintéticos (78, 179). Se trata de una flavoproteína sulfoférica formada por dos tipos de subunidades; una, de peso molecular del orden de 150 kDa, y otra, del orden de 50 kDa, pudiéndose aislar la proteína, según las condiciones de extracción, como un octámero con 4 subunidades de cada tipo (aproximadamente 800 kDa) o un dímero con una subunidad de cada clase (aproximadamente 200 kDa).

En lo que respecta a los organismos eucarióticos no fotosintéticos, se ha purificado y caracterizado parcialmente la NADH-glutamato sintasa de levadura (129) y de Neurospora crassa (69).

En las plantas superiores se ha encontrado la actividad NAD(P)H-glutamato sintasa sobre todo en tejidos no fotosintéticamente activos, como guisantes en germinación (13), nódulos de altramuz (19), cultivo de células de semilla de soja (27) y tallos etiolados de guisante (101), aunque también ha sido detectada y parcialmente purificada en hojas de tomate (10). Existe cierta controversia respecto a la localización intracelular de esta enzima. Así, la enzima de cotiledones de guisante en desarrollo no está asociada a ningún orgánulo (13), mientras que la de cultivos de tejidos y de raíces se ha encontrado exclusivamente en los plastos (154).

Por lo que concierne a las algas, tan sólo se ha descrito la presencia de NADH-glutamato sintasa en Euglena gracilis (108) y en Chlamydomonas reinhardtii (33), donde ha sido recientemente purificada y caracterizada (98).

Las glutamato sintasas dependientes de piridín nucleótidos que han sido descritas en organismos eucariotas tienen pesos moleculares que oscilan entre 158 y 240 kDa, habiéndose sugerido la presencia de grupos prostéticos flavínicos en la enzima de nódulos de altramuz (19), de tallos etiolados de guisante (101) y de C. reinhardtii (98).

Por su parte, la glutamato sintasa dependiente de ferredoxina está presente en cianobacterias, algas y plantas

superiores (10, 11, 82, 83, 84, 85, 154), y su localización intracelular en las plantas superiores es cloroplástica (168), lo que guarda correlación con la presencia de ferredoxina en dichos orgánulos, y establece una clara implicación de la enzima en la asimilación fotosintética del nitrógeno, sugiriendo que es ésta también la localización probable en otros eucariotas fotosintéticos (154).

También se ha descrito la presencia de ferredoxina-glutamato sintasa en tejidos no fotosintéticos tales como raíces de arroz (7), si bien parece que esta proteína es distinta a la de hojas (158).

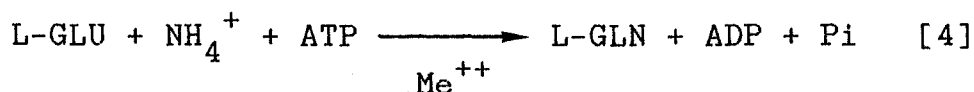
La ferredoxina-glutamato sintasa (E.C. 1.4.7.1) de eucariotas fotosintéticos se ha purificado a partir de hojas de haba (167), maíz (102), espinaca (65, 159), arroz (157), tomate (10) y algas verdes (97), siéndolo hasta homogeneidad electroforética en los cuatro últimos casos citados. Se trata de una proteína de peso molecular comprendido entre 145 y 224 kDa, pero se conocen pocos detalles acerca de su composición (154). Las enzimas mejor caracterizadas han sido la de espinaca, formada por una única cadena polipeptídica de 170 kDa que presenta 1 FAD, 1 FMN, 4 Fe y 4 S lábiles por molécula (65), y la de C. reinhardtii, formada por una única cadena polipeptídica de 146 kDa, con 1 FMN, 1 FAD, 2 Fe y 4 S lábiles por molécula (97). Hasta entonces, todos los intentos efectuados para observar en la enzima de plantas superiores la presencia de grupos transportadores de electrones habían resultado infructuosos (102, 159, 167).

En cianobacterias no se ha detectado la presencia de NAD(P)H-glutamato sintasa (110), o se han obtenido niveles muy bajos de actividad, atribuibles a la acción de una enzima contaminante, la ferredoxina-NADP reductasa, y ferredoxina (59). La actividad ferredoxina-glutamato sintasa fue observada por primera vez en especies de Nostoc y Anabaena (84) y ha sido detectada posteriormente en A. cylindrica (161), en heterocistos de Anabaena 7120 (54), A. variabilis (122), y N. muscorum (55). Sin embargo, salvo su dependencia del donador de electrones, ferredoxina, no hay datos disponibles concernientes a las

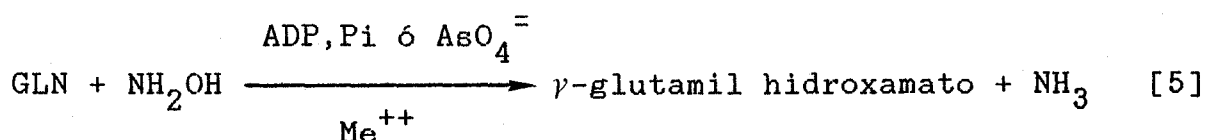
propiedades, tanto químicas como fisiológicas, de la glutamato sintasa aislada de cianobacterias y no ha sido aún purificada ni caracterizada en ningún organismo perteneciente a este grupo. Por este motivo hemos considerado interesante llevar a cabo su purificación y caracterización molecular.

### I.B. GLUTAMINA SINTETASA DE CIANOBACTERIAS

La glutamina sintetasa ha sido ampliamente estudiada en todos los grupos de seres vivos, dada su crucial importancia en el metabolismo celular, y se ha caracterizado la proteína de fuentes muy distintas: bacterias, algas, hongos, plantas superiores y animales (154). Esta enzima es capaz de llevar a cabo la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio, según la siguiente reacción biosintética:



Puede igualmente catalizar la reacción  $\gamma$ -glutamil transferasa, según la ecuación:



La actividad de la enzima en esta reacción transferasa es varias veces superior a la biosintética, por lo que este ensayo suele ser el empleado en las determinaciones rutinarias de actividad, ya que es, además, cuantificable espectrofotométricamente.

En cianobacterias se ha purificado hasta homogeneidad y caracterizado la glutamina sintetasa tanto de especies filamentosas fijadoras de nitrógeno (112, 134, 152) como de unicelulares no fijadoras (42). Tiene una estructura similar a la de la enzima de bacterias quimiotrofas, con un peso molecular cercano a 600 kDa, y está compuesta por doce subunidades idénticas de 50

kDa, ordenadas en dos anillos hexagonales superpuestos. En cianobacterias fijadoras con heterocistos, la glutamina sintetasa se encuentra tanto en células vegetativas como en heterocistos (53).

La glutamina sintetasa de Synechococcus 6301, organismo empleado en este trabajo, se ha purificado a homogeneidad y caracterizado detalladamente (42). La proteína se encuentra asociada a membranas, presentando un peso molecular en su forma nativa de 575 kDa. Está formada por doce subunidades idénticas de 47 kDa con la disposición típica de dos hexágonos superpuestos (86). Las Km determinadas para sus sustratos amonio, ATP y glutamato son 20  $\mu$ M y 0,7 y 5 mM respectivamente. La enzima se inhibe parcialmente por la presencia de altas concentraciones de algunos aminoácidos en el ensayo, siendo alanina y leucina los más efectivos en este proceso. Igualmente, compuestos análogos del glutamato, como son hidroxilisina, fosfinotricina, metionina sulfona y metionina sulfoximina actúan como potentes inhibidores de la actividad in vitro (42). La enzima se inactiva también por incubación con el reactivo de grupos sulfhidrilo pHMB, siendo el proceso reversible por tratamiento con DTE (42).

Se han propuesto varias formas de regulación in vivo para las glutamina sintetetasas de distintas fuentes. Por una parte, hay buenas evidencias experimentales de que la enzima de plantas y enterobacterias está regulada por la carga energética de la célula, siendo inhibible in vitro de forma competitiva por algunos nucleótidos. Igualmente, muchas glutamina sintetetasas, y especialmente las de plantas superiores, están sometidas in vitro a inhibición por varios aminoácidos. El efecto de estos es en muchos casos acumulativo, sugiriendo el funcionamiento in vivo de un sistema de regulación por retroinhibición.

Por otra parte, se han descrito varios mecanismos de inactivación reversible. El mejor caracterizado es el de adenilación, proceso complejo por el cual la fuente de nitrógeno regula los niveles de actividad en enterobacterias y otros procariotas. En la regulación interviene una cascada de

reacciones que termina en la unión covalente de un grupo adenililo por subunidad de la enzima, con su consiguiente inactivación. El fenómeno es reversible por hidrólisis de este enlace (143).

En hongos, el mecanismo de regulación propuesto se basa en cambios reversibles en el estado de agregación de la enzima, variando entre forma nativa activa y forma disociada parcialmente inactiva.

Por último, en algunos organismos se habla también de regulación por modificación conformacional. En Lemna se ha demostrado la inactivación reversible de la glutamina sintetasa por oscuridad y amonio, habiéndose propuesto un mecanismo de regulación por oxidación-reducción de grupos tioles en la proteína. Este modelo se ha propuesto también para la modulación por amonio de la enzima de Bacillus subtilis. En la cianobacteria filamentosa Anabaena cylindrica, la glutamina sintetasa se inactiva por oscuridad o por adición de amonio al medio de cultivo, habiendo sido observado este efecto en otras cianobacterias autótrofas estrictas, incluyendo Synechococcus 6301. Los autores discuten esta regulación en términos de procesos de oxidación-reducción (132).

En algas verdes y algunas cianobacterias la glutamina sintetasa puede regularse in vitro por cambios redox mediados por el sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa (162, 163).

Desde la observación de los Ziegler en los años 60 (182) de que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa variaba sus niveles de actividad con la luz, se han observado comportamientos semejantes en varias enzimas del ciclo de Calvin, y los trabajos se han extendido rápidamente a las principales rutas metabólicas de muy diversos organismos fotosintéticos. Estudios con inhibidores de síntesis de proteína prueban que estos cambios en los niveles de actividad son debidos a modificación post-traducciona de la enzima (inactivación-reactivación) y no a variaciones en los niveles de proteína. Sin embargo, no está aún demostrado que las enzimas activas o inactivas sufran modificaciones covalentes, por lo que este proceso de regulación

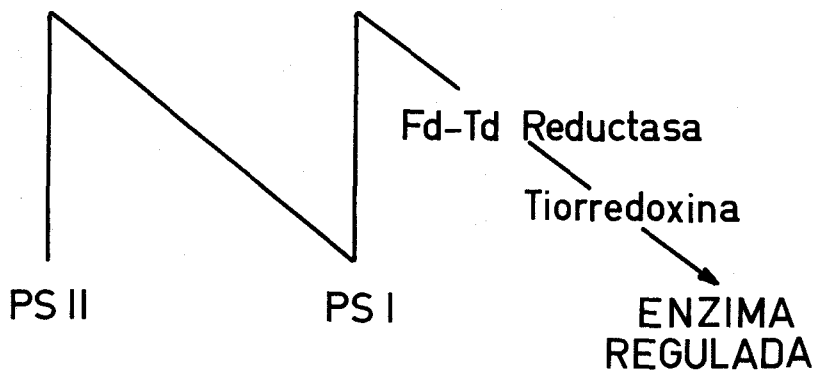
suele denominarse con el término general de fotomodulación enzimática (5).

De todos los trabajos publicados sobre el fenómeno se pueden extraer dos conclusiones definitivas que lo caracterizan (73): a) el efecto de la luz requiere que el sistema de transporte de electrones sea funcional, y b) la luz puede sustituirse in vitro por el reductor artificial DTT.

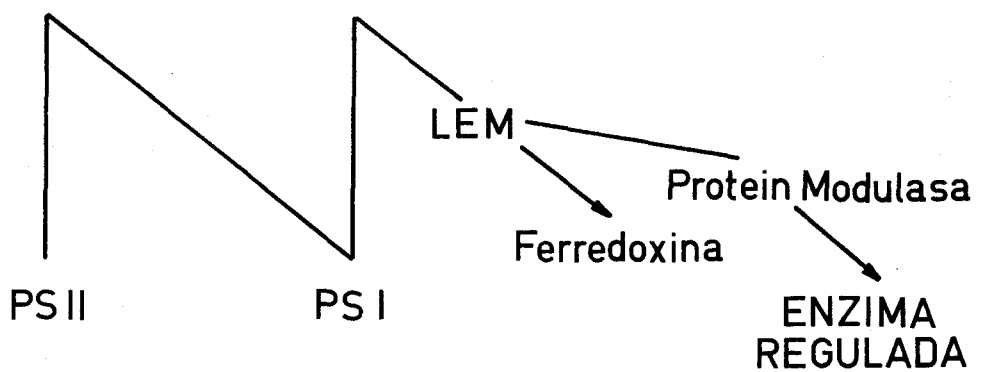
Se han propuesto dos mecanismos principales para explicar el fenómeno de fotomodulación, implicando ambos una secuencia de oxidaciones-reducciones de grupos tioles vecinales: el grupo de Buchanan ha desarrollado un modelo en el que intervienen ferredoxina, tiorredoxina y ferredoxina-tiorredoxina oxidorreductasa, todas ellas proteínas solubles; en el modelo desarrollado por el grupo de Anderson intervienen un factor proteico unido a membrana, LEM (light effect mediator) y una proteína soluble unida a ferredoxina (proteín/modulasa). Las dos propuestas se esquematizan en la figura 1. En ambos casos, la activación de una enzima por luz es consecuencia de la reducción de grupos sulfhidrilo de la misma. Según el primer modelo, ésta estaría mediada por tiorredoxinas más o menos específicas, reducidas a su vez, in vivo, por la ferredoxina-tiorredoxina oxidorreductasa. Según la propuesta de Anderson, el sistema sería independiente de ferredoxina, y la secuencia de reacciones de oxidación-reducción de grupos tioles iría desde LEM (reducido por PS I) hasta la proteína regulada, pasando por la proteína modulasa. Ambos sistemas son reproducibles in vitro mediante incubación con DTT de los distintos componentes de cada uno de ellos.

La semejanza entre estos dos modelos es evidente. Algunas de las discrepancias observadas entre ellos pueden ser atribuidas al modo de preparación de las membranas tilacoidales, ya que la demostración in vitro de la intervención o no de ferredoxina y tiorredoxina en el proceso de regulación implica con frecuencia el empleo de cloroplastos aislados y lavados de estos componentes proteicos. Se podría considerar entonces el sistema LEM como un pseudo sistema ferredoxina-tiorredoxina (73).

Existe un tercer modelo, totalmente distinto,



Sistema ferredoxina-tiorredoxina



Sistema LEM

Figura 1: Modelos de regulación por fotomodulación

Tomados de (73).

únicamente descrito hasta ahora en la piruvato, fosfato diquinasa de plantas  $C_4$ . En él no intervienen grupos sulfhidrilo, sino fosfato, ADP y una proteína reguladora encargada de fosforilar la proteína blanco (5).

En cianobacterias, varias enzimas parecen sensibles a un sistema de regulación redox mediado por tiorredoxina: nitrito reductasa, glutamina sintetasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa, y hay indicios de que el sistema ferredoxina/tiorredoxina pueda ser funcional en este grupo de organismos. En este sentido, se han detectado tiorredoxinas en varias especies (138), habiendo sido purificadas en algunas de ellas (49, 135, 178). Igualmente, se ha encontrado una ferredoxina-tiorredoxina oxidorreductasa en Nostos muscorum (178).

Sin embargo, la modulación por luz in vivo sólo se ha descrito para la glutamina sintetasa, nitrito reductasa, isocitrato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (37, 163).

En este trabajo, nos hemos centrado en los aspectos menos estudiados de las dos enzimas de la ruta. Por una parte, hemos purificado y caracterizado la glutamato sintasa de Synechococcus 6301, habiendo sido necesario previamente desarrollar un método de ensayo que nos permitiera seguir con facilidad la actividad y, por otra, hemos estudiado el comportamiento de la glutamina sintetasa en transiciones luz-oscuridad, caracterizando la fisiología del proceso.



## II. MATERIALES Y METODOS

## II.A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### II.A.1. Organismos empleados

Los microorganismos utilizados en este trabajo son las cianobacterias unicelulares no fijadoras de nitrógeno Synechococcus PCC 6301 (antes Anacystis nidulans L-1402-1), procedente de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen, y Synechocystis PCC 6803, procedente del laboratorio de F.J. Espardellier, Gyf sur Yvette (Francia).

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

#### II.A.2.1. Condiciones estándar de cultivo

Las células se cultivan fotoautotróficamente y en condiciones de esterilidad, utilizando recipientes de vidrio de diferentes tamaños en función del uso al que estén destinadas: a) tubos de 100 ml de capacidad, llenos con 30 ml, para el mantenimiento de las líneas de cultivo y para algunos estudios fisiológicos; b) frascos de Roux de 1 litro para los estudios fisiológicos (luz-oscuridad, etc...) conteniendo 750 ml; c) botellones de 10 ó 20 litros de capacidad, para obtener el material de partida para las purificaciones. En este último caso, se omiten las condiciones de esterilidad, si bien el inóculo es estéril, sin que se presenten problemas de contaminación.

Para cultivar las células de Synechococcus 6301 se emplea un medio sintético modificado a partir del descrito por Allen y Arnon (2). Dicho medio contiene:  $\text{KNO}_3$ , 20 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM;  $\text{NaCl}$ , 2 mM;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12 mM y  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM en agua. A cada litro de medio se le añade 1 ml de solución de Fe-EDTA y 1 ml de solución de micronutrientes. La solución de Fe-EDTA se prepara disolviendo 16 g de EDTA (ácido libre) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y mezclándolos con una disolución que contiene 13,7 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  en 364 ml de agua (8). A través de la mezcla se borbotea aire durante varias horas, a fin de oxidar completamente el hierro. La solución final tiene un pH aproximado de 3, y contiene 5 mg de hierro y 13 mg de potasio por ml.

La solución de micronutrientes utilizada es una modificación de la solución de metales A<sub>5</sub> (3). Contiene, en 1 l de agua: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,86 g; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,81 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,252 g; ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,222 g y CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 79 mg.

Para cultivar las células de Synechocystis 6803 se emplea el medio sintético descrito por Herdman (62) suplementado con 20 mM de KNO<sub>3</sub> ó 15 mM de NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno. El medio contiene además: EDTA, 2,68 mM; MgSO<sub>4</sub>, 0,3 mM; CaCl<sub>2</sub>, 0,25 mM; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,19 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 4 µM; NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM en agua. A cada litro de medio se le añaden 0,5 ml de una solución de hierro-citrato y 1 ml de la solución de micronutrientes descrita para Synechococcus 6301 (A<sub>5</sub> modificado). La solución de hierro-citrato se prepara mezclando 6 g de ácido cítrico·6 H<sub>2</sub>O con 3 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 250 ml de agua.

Los medios, conteniendo todos sus componentes a excepción del fosfato y el bicarbonato, se colocan en los correspondientes frascos de cultivo, tapados con algodón graso atravesado por una varilla de vidrio hueca de longitud algo superior a la altura del frasco y a cuyo extremo exterior se conecta un tubo de goma parcialmente relleno de algodón graso y cerrado con pinzas.

La esterilización se consigue calentando en un autoclave Selecta (España) modelo P durante 20 minutos a 1 atm de presión (121°C). La solución de fosfato y bicarbonato se esteriliza separadamente del resto del medio para evitar la precipitación de sales de fosfato y se añade, una vez fría, en condiciones estériles.

El crecimiento se lleva a cabo en baños termostatzados a 40°C para Synechococcus 6301 y a 35°C para Synechocystis 6803, bajo una iluminación continua de 25 W/m<sup>2</sup>, suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20W/D o similares). A través del medio de cultivo se burbujea una mezcla de aire-CO<sub>2</sub> en la proporción 98,5:1,5 (v/v) a fin de garantizar la agitación y el suministro de aire y CO<sub>2</sub> al cultivo.

Para la preparación del inóculo se parte de células cultivadas en medio sólido, de igual composición que el medio líquido pero suplementado con agar al 1,5%, o bien de células procedentes de cultivos en medio líquido.

### II.A.2.2. Condiciones especiales de cultivo

En el estudio del efecto de condiciones de oscuridad sobre alguna actividad enzimática, estas condiciones se obtienen envolviendo el recipiente conteniendo la suspensión celular en papel de aluminio, hasta obtener una oscuridad absoluta en el interior. Las condiciones de gaseo y temperatura no se alteran.

### II.A.3. Recogida de células

Cuando el volumen de células a recoger es menor de 3 l, la recogida se efectúa por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos. En caso de cantidades superiores, se utiliza un sistema de centrifugación en flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum (Sorvall, EE.UU.) a 18.000 x g y 4°C. El rendimiento de los cultivos es aproximadamente de 1 g de peso fresco por litro de medio en tres días de crecimiento, partiendo de inóculos de 1/12 del volumen total.

## II.B. PREPARACIONES

### II.B.1. Preparación de extractos celulares

Aproximadamente 80 g (peso fresco) de células provenientes de 80 litros de cultivo, cultivadas y recogidas como se ha indicado en el apartado anterior, y conservadas a -80°C, se dejan descongelando durante una noche a 4°C. Posteriormente se resuspenden en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5; EDTA, 1 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM; glutamina, 1 mM y  $\alpha$ -cetoglutaratato sódico, 1 mM (tampón estándar, denominado tampón A) hasta un volumen final de aproximadamente 200 ml.

La suspensión celular se divide en tres porciones de aproximadamente 70 ml que se someten por separado a tratamiento con ultrasonidos durante 16-20 periodos de 30 segundos alternados con otros tantos de igual duración en los que se interrumpe el tratamiento, a fin de evitar subidas excesivas de temperatura. Durante todo el proceso, el recipiente conteniendo las células se mantiene sumergido en un baño de agua con hielo a 0°C.

Justo antes de iniciar el tratamiento de rotura, cada fracción de la suspensión se suplementa con una solución de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 100mM (en isopropanol) hasta una concentración final de 1 mM. Esto se hace así debido a la gran inestabilidad de este inhibidor de proteasas en soluciones acuosas ( $t_{1/2}$ =30 minutos, 74).

La frecuencia de la oscilación es de 20 KHz y su potencia de aproximadamente 100 W (sonicador Branson, Inglaterra, modelo B12).

Una vez tratadas con ultrasonidos las tres fracciones, se vuelven a mezclar y se centrifugan a 3.600 x g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifuga durante 15 minutos a 16.000 x g (para eliminar restos de membranas). El sobrenadante de esta segunda centrifugación (unos 195 ml) constituye el extracto crudo libre de células del que se parte en las purificaciones a gran escala.

## II.B.2. Otros métodos de rotura

Antes de adoptar el tratamiento de ultrasonidos como método estándar para la obtención de extractos acelulares para la purificación de glutamato sintasa a gran escala, se ensayaron otros diversos métodos:

### II.B.2.1. Prensa de French

Una suspensión celular (5-10 ml) conteniendo 0,5 mg clorofila/ml (aproximadamente 62 mg de peso fresco/ml) en tampón fosfato 50 mM pH 7,5 suplementado con EDTA 0,5 mM y DTE 0,2 mM, se somete a tratamiento de extrusión dos veces a 16.000 psi en una prensa hidráulica de French (Aminco, EE.UU.) cuyo recipiente metálico ha sido preenfriado a -20°C. La suspensión resultante se centrifuga a 10.000 x g durante 15 minutos, obteniéndose un sobrenadante libre de células.

### II.B.2.2. Homogeneizador por vibración "Bühler"

El método es una ligera modificación del de Manzano (94). Un sedimento de células de aproximadamente 1,5 g de peso

húmedo se mezcla con 1 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 conteniendo  $\alpha$ -cetoglutarato, 1 mM; glutamina, 1 mM; PMSF, 0,5 mM y se añaden perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro hasta formar una pasta consistente (aproximadamente 10 ml de perlas por gramo de peso fresco). El extracto crudo se prepara rompiendo las células por vibración a 4°C durante 3 minutos, en un homogeneizador por vibración Bühler accionado a su máxima potencia (E. Bühler, Tübingen, R.F.A., modelo VI2). El material roto se extrae en tres veces, con un total de 20 ml del mismo tampón por gramo de peso fresco de células. Tras separar las perlas por decantación, el extracto resultante se centrifuga durante 10 minutos a 3600 x g.

#### II.B.2.3. Choque hipotónico de esferoplastos obtenidos por tratamiento con lisozima

Se sigue un procedimiento similar al descrito por Candau (26), con ligeras modificaciones. Las células se recogen por centrifugación a 4.500 x g durante 10 minutos y se resuspenden en tampón fosfato potásico, pH 7, 50 mM (10ml/g peso fresco de células) suplementado con sacarosa 0,5 M y EDTA.Na<sub>2</sub> 5 mM. Se añaden a la suspensión 100 mg de lisozima por g de células y se incuba durante 4 horas a 35°C. Los esferoplastos resultantes se recogen centrifugando a 4.500 x g durante 10 minutos, y tras lavar una vez con el mismo tampón, se resuspenden con tres volúmenes de tampón fosfato potásico, pH 7, 20 mM. Tras dos horas de choque hipotónico en frío, los restos celulares se eliminan centrifugando 10 minutos a 4.500 x g.

#### II.B.3. Purificación de ferredoxina

La ferredoxina de Synechococcus 6301 se purifica siguiendo el procedimiento descrito por Smillie y Entsch (147) con ligeras modificaciones. El método modificado comprende los siguientes pasos básicos: obtención de polvos de acetona; extracción con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5; fraccionamiento con sulfato amónico (60 a 100% de saturación); cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y cromatografía de intercambio iónico de exclusión molecular en Sephadex A-25.

Las fracciones conteniendo ferredoxina eluidas en la última cromatografía (aproximadamente 15 ml) se dializan frente a 2 litros de tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7,5 durante al menos 48 horas, con varios cambios del tampón, tras lo cual se utiliza directamente para la obtención de gel de ferredoxina sefarosa (apartado II.B.4) o bien se liofiliza en varias fracciones para ser utilizada en los ensayos enzimáticos.

La relación de valores de absorbancia  $A_{420}/A_{280}$  de las preparaciones que se obtienen no es demasiado buena ( $\geq 0,2$ ) debido probablemente a la contaminación por ácidos nucleicos (no se emplean nucleasas en los primeros pasos), aunque una electroforesis de las preparaciones muestra un alto grado de pureza (no se observan bandas de impurezas de proteínas aplicando muestras de 20  $\mu$ g de proteína).

#### II.B.4. Preparación de gel de ferredoxina-sefarosa

La Sefarosa-4B activada con bromuro de cianógeno se deja hinchar durante 5-10 minutos en HCl 1 mM, tras lo cual se lava por filtración en un embudo de placa porosa con 200 ml de HCl 1mM por gramo de gel seco.

La solución de ferredoxina de Synechococcus 6301 purificada como se indica en el apartado anterior (aproximadamente 12 mg de ferredoxina/ml tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7,5) se lleva a pH 10,5 por adición de tampón carbonato/bicarbonato sódico hasta una concentración de 0,1 M y se le añade la cantidad necesaria de NaCl para alcanzar una concentración final de 0,25 M, tras lo cual se mezcla con la sefarosa ya tratada, en una proporción aproximada de 10 mg de ferredoxina por ml de gel (1 g de gel seco equivale a 3,5 ml de gel hinchado). La mezcla se mantiene a 4°C con una agitación suave y constante durante 12 a 24 horas. Transcurrido este tiempo, la ferredoxina no unida se elimina por filtración, seguida de lavado con tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7,5 suplementado con 0,3 mM de EDTA.Na<sub>2</sub> (20 ml por gramo de gel seco). Los grupos de la sefarosa activada que no hayan reaccionado con la ferredoxina se bloquean incubando durante 1 a 5 horas con Tris-HCl 0,1 M pH 8 en una proporción de 20 ml por gramo de gel seco.

A partir de la absorbancia a 420 nm de los tampones de

lavado, estimamos que, en estas condiciones, un alto porcentaje de la ferredoxina queda unida covalentemente a la matriz, obteniéndose un gel de color marrón rojizo conteniendo unos 9,5 mg de ferredoxina por ml de gel.

Una vez bloqueados los grupos de la sefarosa con Tris, el gel se somete a una serie de lavados consecutivos por filtración con 5 volúmenes de tampón acetato 0,1 M, pH 4, 1 M NaCl, seguidos de 5 volúmenes de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8, conteniendo 1 M NaCl, repitiéndose el proceso 4 veces.

Finalmente, el gel se empaqueta en una columna del tamaño adecuado. Antes de utilizarse por primera vez y después de cada cromatografía, el gel de ferredoxina-sefarosa se lava con NaCl 1,5 M en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, para eliminar cualquier posible proteína unida inespecíficamente.

Mantenido a 4°C, el gel es estable durante meses, si bien se observa una decoloración progresiva bastante rápida al emplear el tampón estándar de purificación, tampón A, que contiene fosfato potásico,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamina, EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol. La experiencia de otros laboratorios parece indicar que es este último compuesto el causante de la pérdida de color. Por este motivo, la columna sólo se equilibra con el tampón estándar justo antes de proceder a su utilización, manteniéndose antes y después en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5.

#### II.B.5. Obtención de antisuero de conejo anti-GS

Glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 purificada hasta homogeneidad (42) se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida. Secciones de estos geles conteniendo la enzima se sumergen en solución salina tamponada (PBS) y se trituran a alta velocidad con un homogeneizador, hasta obtener una solución uniforme, a la que se añade un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund. Se homogeniza de nuevo la suspensión hasta conseguir una emulsión densa y uniforme, que se inyecta en varias dosis de 0,6 ml en distintas zonas del cuerpo de una coneja blanca de raza neozelandesa.

A partir del quincuagésimo día tras la primera inyección de antígeno, se inicia la extracción periódica de sangre de



la cual se obtienen los anticuerpos.

Una vez extraída, la sangre se centrifuga a 48.000 x g durante 10 minutos a 10°C. El sobrenadante obtenido se incuba durante 15 minutos a 56°C con el fin de inactivar el complemento. Seguidamente se enfría a 4°C y se somete a precipitación salina por sulfato amónico hasta una saturación del 45%, manteniéndose durante 30 minutos a 4°C con agitación suave. La suspensión resultante se centrifuga a 27.000 x g durante 15 minutos.

El sedimento (de aspecto blanco lechoso) se resuspende en tampón fosfato potásico 20 mM pH 6,3 y se somete a diálisis frente al mismo tampón durante 12-18 horas. La suspensión obtenida se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 x g y el sobrenadante se aplica a una columna de intercambio iónico de DEAE-Sephacel de 3,2 x 20,5 cm equilibrada con el mismo tampón, a 120 ml/hora. El antisuero no queda retenido en la columna, apareciendo en el volumen de elución. Se mide la absorbancia a 280 nm de las fracciones del eluato y se mezclan todas aquellas con una absorbancia mayor de 1. Esta suspensión se puede concentrar, obteniéndose la preparación definitiva, que constituye el antisuero anti-GS utilizado en los inmunoensayos.

## II.C. ENSAYOS ENZIMATICOS

### II.C.1. Ensayo de la actividad glutamato sintasa

#### II.C.1.1 Ensayo in situ de la actividad glutamato sintasa

Para ello se sedimentan por centrifugación a 12.000 x g durante 1 minuto (Eppendorf) células conteniendo aproximadamente 25 µg de clorofila y se resuspenden en 0,9 ml de mezcla de ensayo que contiene: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 45 µmol; glutamina, 5 µmol; α-cetoglutarato, 5 µmol; aminoxiacetato, 5 µmol y metilviológeno, 0,25 µmol.

Tras añadir 20 µl de tolueno y agitar vigorosamente durante 1 minuto, la reacción se inicia con la adición de 0,8 mg de ditionito sódico disuelto en 100 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0,11 M.

A los 0 y 15 minutos de incubación a 30°C, se toma una

fracción alícuota de 0,25 ml a la que se añaden 0,15 ml de HCl 1 N para detener la reacción. Los restos celulares se eliminan por centrifugación a 12.000 x g durante 4 minutos, tras lo cual una fracción alícuota del sobrenadante se diluye 25 veces con fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Las concentraciones de glutamato y glutamina presentes en esta solución se determinan posteriormente según se indica en el apartado II.D.1.

Una unidad de actividad glutamato sintasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de glutamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

#### II.C.1.2. Ensayo in vitro de la actividad glutamato sintasa

La mezcla de ensayo contiene, en un volumen final de 0,9 ml: tampón fosfato potásico, pH 7, 45  $\mu\text{mol}$ ; glutamina, 5  $\mu\text{mol}$ ;  $\alpha$ -cetoglutarato, 1  $\mu\text{mol}$ ; aminooxiacetato, 5  $\mu\text{mol}$ ; ferredoxina, 10 ó 20 nmol y una cantidad apropiada de enzima glutamato sintasa.

La reacción se inicia por adición de 0,8 mg de ditionito sódico disueltos en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaHCO}_3$  0,11M.

A los 0 y 15 minutos de incubación a 30°C, se toman muestras alícuotas de 0,25 ml que se procesan del mismo modo que para el ensayo in situ (apartado II.C.1.1).

#### II.C.2. Ensayo in situ de la actividad glutamina sintetasa

##### II.C.2.1. Determinación de la actividad transferasa

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estima según el método descrito por Shapiro y Stadtman (144) en células previamente permeabilizadas con el detergente MTA. Para ello se sedimentan por centrifugación a 12.000 x g durante 1 minuto en centrífuga Eppendorf células conteniendo entre 15 y 25  $\mu\text{g}$  de clorofila y se resuspenden en 0,85 ml de una mezcla de ensayo que contiene: tampón HEPES-NaOH, pH 7, 56  $\mu\text{mol}$ ; L-glutamina, 34  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MnCl}_2$ , 3,4  $\mu\text{mol}$  y ADP, 0,425  $\mu\text{mol}$ . A esta suspensión se le añaden 0,1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 20  $\mu\text{l}$  de una solución de MTA al 1,25% en  $\text{H}_2\text{O}$ . Después de agitar

vigorosamente durante 10 s, la reacción se inicia por adición de 20  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  disueltos en 50  $\mu\text{l}$  de agua. Los blancos se obtienen con ensayos paralelos a los que se añade agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incuba durante 5 minutos a 30°C. La reacción se para por adición de 2 ml de una disolución de  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido (ver apartado II.D.6), reactivo revelador del  $\alpha$ -glutamilhidroxamato producido en la reacción.

Una unidad de actividad transferasa de glutamina sintetasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -glutamilhidroxamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

#### II.C.2.2. Determinación de la actividad biosintética

Para ello se sedimentan por centrifugación a 12.000 x g durante 1 minuto (centrífuga Eppendorf) células conteniendo aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  de clorofila y se resuspenden en 0,9 ml de una mezcla de ensayo que contiene: tampón HEPES-NaOH, pH 7, 45  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10  $\mu\text{mol}$  y L-glutamato monosódico, 25  $\mu\text{mol}$ .

Tras añadir 20  $\mu\text{l}$  de MTA al 1,25% en agua y agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se inicia por adición de 0,1 ml de ATP 60 mM preparado en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7. A los 0 y 15 minutos de incubación a 30°C, se toma una fracción alícuota de 0,25 ml a la que se añaden 0,15 ml de HCl 1 N. Los restos celulares se eliminan por centrifugación a 12.000 x g durante 4 minutos, tras lo cual una fracción alícuota del sobrenadante se neutraliza con fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 hasta un volumen final de 2,5 ml. Las concentraciones de glutamato y glutamina presentes en esta solución se determinan posteriormente según se indica en el apartado II.D.1.

#### II.C.3. Ensayo de la actividad glutamato deshidrogenasa

##### II.C.3.1. Ensayo in vitro de la actividad glutamato deshidrogenasa

La actividad glutamato deshidrogenasa se estima por producción de glutamato dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio,

o bien espectrofotométricamente a 340 nm como desaparición de NADPH. La mezcla de ensayo contiene, en un volumen final de 1 ml:  $\alpha$ -cetoglutarato potásico, 10  $\mu\text{mol}$ ; Tris-HCl pH 8, 85  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 50  $\mu\text{mol}$ ; NADPH, 0,1  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se inicia por la adición del  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Para la determinación de glutamato, se toma una muestra de 0,25 ml a los 0 y 15 minutos de incubación a 30°C, a la que se añaden 0,15 ml de HCl 1N. Tras centrifugar a 12.000 x g durante 4 minutos, una fracción alícuota del sobrenadante se diluye de 12 a 25 veces con tampón fosfato 50 mM, pH 7,5. La concentración de glutamato presente en esta solución se determina posteriormente según se indica en el apartado II.D.1.

#### II.C.3.2. Ensayo in situ de la actividad glutamato deshidrogenasa

Para determinar in situ la actividad de la glutamato deshidrogenasa, se sedimentan por centrifugación a 12.000 x g durante 1 minuto (centrífuga Eppendorf) células conteniendo aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  de clorofila y se resuspenden con 0,9 ml de una mezcla de ensayo que contiene:  $\alpha$ -cetoglutarato potásico, 10  $\mu\text{mol}$ ; Tris-HCl pH 8, 85  $\mu\text{mol}$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 50  $\mu\text{mol}$ . La reacción se inicia por adición de 0,1  $\mu\text{mol}$  de NADPH en 0,1 ml de agua. El glutamato formado se determina como en el ensayo in vitro (apartado II.C.3.1) a los 0 y 20 minutos de incubación a 30°C.

#### II.C.4. Ensayo de otras enzimas

Las proteínas usadas como patrones en la determinación de parámetros físico-químicos de la glutamato sintasa que presentan actividad enzimática, se ensayan como se indica a continuación:

##### II.C.4.1. Ensayo de la actividad alcohol deshidrogenasa

La actividad alcohol deshidrogenasa se determina espectrofotométricamente a 30°C siguiendo el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción del  $\text{NAD}^+$  por etanol, según un procedimiento modificado a partir del descrito por

Bergmeyer (16). La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 1 ml: tampón glicina-NaOH, pH 8,8 , 38  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 126  $\mu\text{mol}$ ; hidrocloreuro de semicarbazida, 126  $\mu\text{mol}$ ; etanol, 85  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{NAD}^+$ , 1,5  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de enzima.

#### II.C.4.2. Ensayo de la actividad catalasa

La actividad catalasa se determina espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm que resulta de la descomposición enzimática del agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30°C, según el procedimiento de Bergmeyer (16). La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 1 ml: tampón fosfato potásico, pH 6,8 , 45  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10,5  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de enzima.

#### II.C.4.3. Ensayo de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se determina espectrofotométricamente siguiendo el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción del  $\text{NADP}^+$  dependiente de glucosa-6-fosfato a 30°C. La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl, pH 7,6, 86  $\mu\text{mol}$ ; glucosa-6-fosfato (sal sódica), 1  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{NADP}^+$ , 0,4  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{MgCl}_2$ , 6,9  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de enzima (16).

#### II.C.4.4. Ensayo de la ferredoxina-NADP reductasa

La ferredoxina-NADP reductasa de *Anabaena* sp 7119 se ensaya espectrofotométricamente siguiendo su actividad NADPH-citocromo  $c_2$  reductasa. La mezcla de reacción, ligeramente modificada a partir de la descrita por Shin (145), contiene en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl, pH 7,5, 100  $\mu\text{mol}$ ; citocromo  $c_2$  de corazón de caballo, 0,16 mg; ferredoxina de *Synechococcus* 6301, 10 nmol; NADPH, 0,5  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de la preparación enzimática. La reacción se inicia mediante la adición del NADPH. Una unidad de la enzima se define como la cantidad que cataliza la reducción de 1  $\mu\text{mol}$  de citocromo  $c_2$  por minuto a 30°C.

#### II.C.4.5. Ensayo de la actividad nitrato reductasa

La mezcla de reacción incluye, en un volumen final de 1 ml: tampón  $\text{CO}_3^{=}/\text{HCO}_3^-$ , pH 10,5, 100  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{KNO}_3$ , 20  $\mu\text{mol}$ ; metilviológeno, 4  $\mu\text{mol}$ ;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 2 mg disueltos en 1 ml de una solución 0,3 M de  $\text{NaHCO}_3$  (9,8  $\mu\text{mol}$  y 30  $\mu\text{mol}$ , respectivamente), y una cantidad adecuada de muestra. El ensayo se inicia por adición del ditionito, se desarrolla durante 5 minutos a 30°C, y se detiene provocando la oxidación rápida del ditionito mediante agitación vigorosa hasta la decoloración del color azul del metilviológeno reducido (26).

El nitrito formado en la reacción se determina como se indica en el apartado II.D.7.

#### II.D. METODOS ANALITICOS

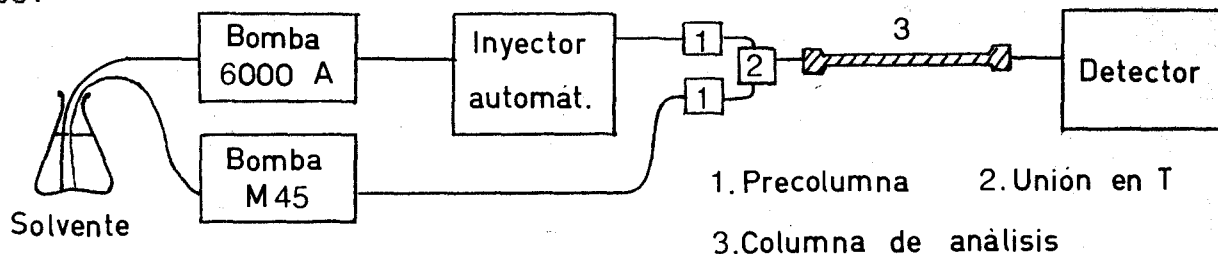
##### II.D.1. Separación y determinación de glutamato y glutamina mediante HPLC

###### II.D.1.1. Descripción del cromatógrafo

El sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) empleado para el análisis de aminoácidos de los ensayos de glutamina sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa está compuesto de un inyector U6K de Waters (EE.UU.) conectado a una bomba Waters modelo 6000A que crea un flujo constante de solvente. La salida del inyector está conectada a la columna de análisis (precedida de una precolumna de protección rellena de perlas de vidrio), en serie con un detector de fluorescencia Ac-420 de Waters provisto de filtros de 338 nm (excitación) y 425 nm (emisión). La temperatura de la columna se mantiene a 45°C gracias a un horno termorregulado Waters.

Cuando se emplea el sistema de inyección automático, el inyector U6K se sustituye por el W.I.S.P. 710B de Waters conectado del mismo modo y a través del cual fluye el solvente impulsado por la bomba 6000A. Dado que la derivatización automática con este sistema requiere que el flujo en el inyector sea nulo durante la toma de muestras y el tiempo que dura la reacción de derivatización, y para no crear sobrepresiones en la

columna debido a variaciones bruscas del mismo, el flujo de solvente por la columna durante este tiempo se mantiene gracias a una bomba auxiliar modelo M45 de Waters conectada mediante una unión en T directamente a la columna, según el esquema siguiente:



Una vez transcurridos los 90 s empleados en la derivatización, el solvente se suministra nuevamente con la bomba A a través del inyector, arrastrando la muestra a analizar ya derivatizada.

En ambos casos (inyección manual y automática), el funcionamiento de la(s) bomba(s) se regula con un controlador-formador de gradiente modelo M-720, y los datos obtenidos del detector se procesan directamente en la unidad de procesado de datos M-730, ambos de Waters.

#### II.D.1.2. Derivatización de los aminoácidos

Las muestras de los ensayos enzimáticos obtenidas como se indica en los apartados II.C.1-3 se derivatizan antes de su inyección, siguiendo el método de Lindroth y Mopper (89). Para ello, 50  $\mu$ l de cada muestra se incuban a temperatura ambiente durante 90 s con 150  $\mu$ l de una mezcla derivatizante conteniendo: 27 mg de o-ftaldialdehído (OPA) disueltos en 0,5 ml de metanol; 4,5 ml de tampón borato sódico 0,4 M, pH 10 y 20  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Transcurrido ese tiempo, se inyectan 40  $\mu$ l de dicha mezcla.

En caso de inyección automática, la derivatización se lleva a cabo en el inyector, que transporta con flujo muy lento (0,1 ml/min) 20  $\mu$ l de mezcla derivatizante y 10  $\mu$ l de muestra tomados consecutivamente, hasta una precolumna de 4 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno rellena de perlas de vidrio, donde permanecen durante 0,75 minutos antes de ser inyectados.

### II.D.1.3. Desarrollo de la cromatografía

La cromatografía en fase reversa de los OPA derivados así obtenidos se lleva a cabo de forma isocrática empleando una columna de octadecilsilano fijado en soporte de sílice tipo  $\mu$ BONDAPACK C<sub>18</sub> o NOVAPAK C<sub>18</sub>, ambas de Waters (EE.UU.), de 15 cm de longitud por 3,9 mm de diámetro interno, precedida por una precolumna de 4 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno, rellena de perlas de vidrio.

Las condiciones de elución son una modificación de las de Martin et al. (99). El tampón empleado es fosfato sódico 20 mM conteniendo 22% de metanol y 2% de tetrahidrofurano, bombeado a través de la columna a un flujo constante de 1ml/min. ó 1,5 ml/min., creando una presión de aproximadamente 2400 psi. Los picos correspondientes a los OPA-derivados de glutamato y glutamina se eluyen con una diferencia mayor de 1 minuto en sus tiempos de retención, resolviéndose totalmente.

El calibrado del sistema se lleva a cabo automáticamente con el procesador de datos M-730 tras inyectar un patrón de concentración conocida de glutamato y glutamina tratado del mismo modo que las muestras.

Al final de los análisis, el sistema completo se lava con varios volúmenes de columna de agua, seguidos de una cantidad equivalente de metanol.

### II.D.2. Análisis de flavinas

La flavina asociada a la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se identifica mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según el método de Light et al. (88), por comparación con patrones de riboflavina, FMN y FAD.

#### II.D.2.1. Extracción de las flavinas

La extracción de la flavina de su apoenzima se lleva a cabo de varias formas.



#### II.D.2.1.1. Extracción por incubación a 100°C

Se sigue una simplificación del método descrito por Faeder y Siegel (39): muestras de 20  $\mu$ l de glutamato sintasa purificada conteniendo entre 10 y 20  $\mu$ g de proteína en tampón estándar se incuban durante 10 minutos a 100°C en tubos de vidrio de 4,5 cm de largo por 4 mm de diámetro interno, tras lo cual se enfrían a 4°C y se centrifugan a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos en centrífuga Eppendorf. El sobrenadante conteniendo la flavina liberada se analiza mediante HPLC como se indica más adelante.

#### II.D.2.1.2. Extracción por hidrólisis ácida a 100°C

Se sigue una modificación del método descrito por Koziol (79): muestras de 20  $\mu$ l de glutamato sintasa purificada conteniendo entre 10 y 20  $\mu$ g de proteína en tampón estándar se incuban durante 45 minutos con 5  $\mu$ l de ácido sulfúrico 0,5 N a 100°C. Tras enfriar las muestras, se neutralizan por adición de 15  $\mu$ l de acetato sódico 2,5 M para obtener un pH final de aproximadamente 6. Finalmente, las muestras se centrifugan a 12.000 x g durante 15 minutos antes de ser analizadas por HPLC.

#### II.D.2.1.3. Extracción por hidrólisis con TCA en frío

El método utilizado es el descrito por Koziol (79): a muestras de 20  $\mu$ l de glutamato sintasa purificada conteniendo entre 10 y 20  $\mu$ g de proteína se les añade un volumen igual de ácido tricloracético al 20% y se incuban a 4°C durante 10 minutos, tras lo cual se centrifugan a 12.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se neutraliza por adición de 10  $\mu$ l de fosfato dipotásico 4 M. La suspensión resultante se analiza mediante HPLC, como sigue.

#### II.D.2.2. Análisis de flavina por HPLC

La separación de las flavinas se lleva a cabo mediante HPLC aplicando el método de elución isocrática descrito por Light *et al.* (88); se emplea un cromatógrafo Waters (EE.UU.)

compuesto por una bomba peristáltica modelo M-6000A, un inyector universal U6K, un controlador de bombas M-720, un procesador de datos e impresor térmico M-730 acoplado a un detector de fluorescencia AC-420, provisto de un filtro de excitación de 450 nm y un filtro de emisión de 530 nm. La separación se lleva a cabo en dos columnas de octadecilsilano en soporte de sílice Novapack C-18 de 15 cm de largo y 3,9 mm de diámetro interno colocadas en serie. Las muestras se inyectan con una microjeringa S.G.E., tipo GSG de 100  $\mu$ l (Australia). El solvente empleado para la elución isocrática de las flavinas es tampón acetato amónico 5 mM, pH 6 suplementado con un 20% de metanol, bombeado a un flujo constante de 0,5 ml/minuto.

Las flavinas se identifican por comparación con patrones externos de riboflavina, FMN y FAD tratados en cada caso del mismo modo que las muestras.

Eventualmente, para la detección de nucleótidos, se conecta en serie al sistema un detector de absorbancia de longitud de onda variable modelo Lambda-Max 481 de Waters (EE.UU.) fijado en 260 nm y conectado a su vez a un registrador Knauer (Berlín).

### II.D.3. Determinación de la composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se determina a partir de la mezcla de aminoácidos obtenidos por hidrólisis de la proteína en medio ácido al vacío a 105°C .

A 12  $\mu$ l de preparaciones de glutamato sintasa purificada en tampón estándar conteniendo unos 10  $\mu$ g de proteína se les añaden 50  $\mu$ l de HCl 7,5 N para obtener una concentración final de 6 N de este ácido. Los distintos viales conteniendo las muestras a hidrolizar se sellan al vacío tras someterlos a cinco ciclos sucesivos de atmósfera de argón seguida de vacío empleando un sistema generador de vacío de salida múltiple de Afora (España). Una vez sellados los viales se mantienen a 105°C durante 24 ó 48 horas en una mufla Selecta (España) modelo 367PE. Transcurrido este tiempo, los viales se enfrían a -20°C durante al menos una hora. Caso de no ser analizadas inmediatamente, las muestras pueden conservarse a -20°C en vacío el tiempo

necesario, ya que en este punto son estables indefinidamente (181).

Antes de ser analizadas, las muestras se neutralizan por adición de  $50 \pm 1 \mu\text{l}$  de NaOH 8 N para obtener un pH final cercano a 6, y se centrifugan a  $12.000 \times g$  durante 2 minutos, quedando listas para su análisis por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. El equipo empleado para ello es el mismo descrito en el apartado II.D.1.1. Los aminoácidos se analizan siguiendo las modificaciones de Kabus (76) del método de derivatización precolumna con o-ftaldialdehído y  $\beta$ -mercaptoetanol descrito por Roth (130), en una columna Novapack  $C_{18}$  de Waters de  $15 \text{ cm} \times 3,9 \text{ mm}$  precedida de una precolumna de igual diámetro interno y 4 cm de largo rellena de perlas de vidrio mantenidas a  $45^\circ\text{C}$ . El volumen de inyección es de  $30 \mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{l}$  de muestra derivatizados con  $20 \mu\text{l}$  de una mezcla cuya composición se detalla en el apartado II.D.1.2. Las condiciones de elución son las descritas por el fabricante (172) modificadas en lo que se refiere a condiciones iniciales y finales de cambio de flujo total, con el fin de no crear cambios bruscos de presión en la columna. Igualmente, se sustituye la composición estándar del solvente de partida (solvente A) por la siguiente: tampón fosfato disódico 50 mM, pH 6,5; metanol, 2% y tetrahidrofurano, 2%.

El método no permite detectar los aminoácidos prolina o cisteína (130), y el triptófano resulta degradado durante la hidrólisis ácida.

El gradiente de elución empleado no permite resolver los picos correspondientes a glicina y serina, por lo que estos aminoácidos se determinan en análisis paralelos empleando como solvente de partida (solvente A) el descrito por Coronil (30): tampón fosfato-acetato 30 mM, pH 7,5, conteniendo 2% de metanol y 2% de tetrahidrofurano.

Los aminoácidos se identifican por comparación con patrones externos purificados para análisis de aminoácidos (Sigma Chemical Co., EE.UU.).

#### II.D.4. Determinación de clorofila

El contenido celular de clorofila *a* se determina espectrofotométricamente en extractos metanólicos de las células

(93). La suspensión celular (0,5 a 1 ml) se centrifuga 1 minuto a 12.000 x g en una centrífuga Eppendorf y el sedimento se resuspende con 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 1 minuto, la preparación se centrifuga de nuevo 2 minutos a 12.000 x g, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante, adecuadamente diluido con metanol, a partir de su absorbancia a 665 nm. El coeficiente de extinción empleado es de  $74,46 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### II.D.5. Determinación de proteína

El contenido celular de proteína se determina directamente en células enteras siguiendo la modificación de Markwell (96) al método de Lowry (90), empleando seroalbúmina bovina como patrón.

En los procesos de purificación de enzimas y cuando se trabaja con extractos crudos, la proteína se determina siguiendo el método de Lowry (90) con las modificaciones de Bailey (12), obteniéndose en cada serie de medidas una recta de calibrado empleando ovoalbúmina como patrón. En los casos en los que este método no se puede utilizar por interferencia con el tampón en el que va la muestra, la proteína se determina según el método de Bradford (22) usando el reactivo para proteínas BIORAD (EE.UU.) y siguiendo el procedimiento de "microensayo" (1-20  $\mu\text{g}$  proteína/ml) recomendado por dicha firma comercial (18). Las rectas de calibrado se obtienen para cada serie de ensayos, utilizando ovoalbúmina como patrón.

#### II.D.6. Determinación de $\gamma$ -glutamil hidroxamato

El  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado en el ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determina por reacción con cloruro férrico en medio ácido (144). A 1 ml de disolución conteniendo  $\gamma$ -glutamil hidroxamato (mezcla de ensayo de la reacción después de 5 minutos de incubación a 30°C) se le añaden 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido, de la siguiente composición: 7,73 ml de HCl (37% p/p), 60 ml de ácido tricloracético (20% p/p) y 33,3 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  llevados a un volumen final de 1 l con agua. La concentración del producto

coloreado formado se determina espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de  $3,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### II.D.7. Determinación de nitrito

El nitrito se determina según el procedimiento descrito por Snell y Snell (150).

A 1 ml de muestra se le añade 1 ml de una disolución 58 mM de sulfanilamida en HCl 2,4 N y 1 ml de una disolución 0,69 mM de dicloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina (NNEDA). Transcurridos 10 minutos, se determina la concentración del complejo coloreado, utilizando un coeficiente de extinción a 540 nm de  $55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### II.D.8. Determinación de parámetros físicos

##### II.D.8.1. Cálculo de la densidad del tampón

La determinación de la densidad del tampón A se lleva a cabo con un aparato Anton Paar DMA 46, fundamentado en la oscilación de frecuencia, termostatzado por efecto Peltier. Los patrones usados para la determinación de las constantes del aparato son aire purificado y agua bidestilada y desionizada, con corrección de datos por la presión.

##### II.D.8.2. Cálculo de la viscosidad dinámica del tampón

La determinación de la viscosidad dinámica del tampón A se fundamenta en la caída de fluido a través de conducto, y se lleva a cabo con un viscosímetro OSWALD termostatzado por baño de agua HETOFRIG. Los patrones usados son agua bidestilada y desionizada.

### II.E. TECNICAS EXPERIMENTALES

#### II.E.1 Centrifugaciones

Para la recogida de células, preparación de extractos

celulares, y en los distintos pasos de purificación, se emplean centrifugas refrigeradas Sorvall (EE.UU.) modelo RC2-B, equipadas con rotores SE-12, SS-34 y GSA.

Las centrifugaciones a baja velocidad (menos de 4.000 x g) de volúmenes pequeños (aproximadamente 5 ml) se realizan a temperatura ambiente en centrifugas de mesa Selecta (España) de receptáculos basculantes.

Para la recogida de células de suspensiones de volumen inferior a 1,5 ml, preparación de muestras para HPLC y centrifugación de volúmenes menores de 1,5 ml, se emplea un centrifuga Eppendorf (R.F.A.) modelo 5414, capaz de alcanzar 12.000 r.p.m. (unas 10.000 x g).

La recogida de grandes volúmenes de células (mayores de 20 l) se lleva a cabo por centrifugación en flujo continuo, empleando un sistema Szent-Gyorgyi-Blum adaptado a una centrifuga Sorvall modelo RC2-B.

En las centrifugaciones en gradiente de sacarosa se usa una ultracentrifuga Beckman Spinco (EE.UU.) modelo L2-65B, utilizando un rotor SW 56Ti de receptáculos basculantes.

#### II.E.2. Centrifugación en gradiente de sacarosa. Determinación de coeficiente de sedimentación

El coeficiente de sedimentación de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se determina por centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa, de acuerdo con el procedimiento descrito por Martin y Ames (100). Cada tubo de centrifuga (Beckman tipo 328874, de polialómero, de 1,11 cm x 6,03 cm) contiene aproximadamente 4,1 ml de un gradiente lineal de sacarosa, desde el 5% en la parte superior del tubo hasta 20% en el fondo, preparado en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, conteniendo 0,15 M de NaCl.

Para la formación del gradiente se utiliza un aparato mezclador Buchler Instruments (EE.UU.) de dos compartimentos, acoplado a una bomba peristáltica LKB 10.200 (Suecia) y un aparato Densi-Flow de Buchler, a un flujo de 18 ml/h. Una vez formados los gradientes, se dejan estabilizar 5 h a 4°C. Las muestras, 0,1 ml de una solución conteniendo la enzima cuyo coeficiente de sedimentación se quiere determinar y las proteínas

marcadoras correspondientes, se depositan cuidadosamente sobre el menisco de los gradientes. La centrifugación se lleva a cabo a 4°C, durante 16 horas a 45.000 r.p.m. (rotor SW 56Ti de receptáculos basculantes) en una ultracentrífuga refrigerada Beckman Spinco modelo L2-65B (EE.UU.). Una vez terminada la centrifugación, los gradientes se eluyen a un flujo de 18 ml/hora, comenzando por el fondo, mediante un sistema de recogida de fracciones Densiflow de Buchler acoplado a una bomba peristáltica LKB 10.200 (Suecia) y a un colector de fracciones automático LKB Ultrorac 7.000. De cada tubo se recogen 23-24 fracciones de 3 gotas cada una.

Se utilizan las siguientes proteínas marcadoras, de coeficiente de sedimentación ( $S_{20,W}$ ) conocido, en las cantidades que se indican: alcohol deshidrogenasa de levadura, 7,61 S (23), 50 µg/gradiente; catalasa de hígado bovino, 11,3 S (23), 30 µg/gradiente; seroalbúmina bovina, 4,31 S (23), 80 µg/gradiente; glucosa-6-P deshidrogenasa de levadura, 6,1 S (180), 50 µg/gradiente y aldolasa de músculo de conejo, 7,35 S (23), 75 µg/gradiente.

### II.E.3. Cromatografías en columna

#### II.E.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

Se emplea DEAE-celulosa microgranular DE-52 (Whatman, Gran Bretaña) equilibrada inicialmente en tampón concentrado (fosfato potásico 0,5 M, pH 7,5) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. Otras condiciones de utilización son las que indica el fabricante. La columna utilizada es de vidrio, de 3 cm de diámetro, empaquetada hasta aproximadamente 10 cm de altura.

Antes de montar las columnas, los gases disueltos en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminan por succión mediante una bomba de vacío Millipore modelo XX5522050 (EE.UU.).

Las muestras se aplican directamente sobre el lecho con pipeta de vidrio.

El flujo de solvente en las columnas se regula por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10.200 de cabezas reductoras intercambiables.

Las fracciones del eluato se recogen automáticamente con un colector LKB modelo Ultrorac 7.000.

### II.E.3.2. Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-sefarosa

Se utiliza una columna de vidrio de 1,8 x 6,5 cm ó de 0,8 x 4,5 cm.

Antes de su uso, los geles se equilibran en la columna con 7 volúmenes del tampón estándar. Para su reutilización los geles se lavan en las columnas con 5 volúmenes de lecho de tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5 suplementado con 1,5 M de KCl y posteriormente se equilibran con tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5.

### II.E.3.3. Cromatografía de filtración en gel. Determinación del radio de Stokes y peso molecular

El radio de Stokes de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se estima mediante cromatografía de filtración en gel, siguiendo el método descrito por Siegel y Monty (146). Para ello se utiliza una columna de vidrio calibrado K16/40 Pharmacia (Suecia) conteniendo un lecho de 1,6 x 32 cm de Sephacryl S-300 Superfine Pharmacia limitado en su parte superior por una cestilla de aplicación de muestras. La columna se equilibra con tampón fosfato potásico 20 mM pH 7,5, suplementado con 0,15 M de NaCl. Las muestras, de 0,3 ml, se aplican directamente con repipeta sobre la cestilla tras haber llevado el menisco del eluyente hasta el límite superior del lecho. Una vez que la muestra ha penetrado, la columna se vuelve a llenar con el eluyente y la cromatografía descendente se desarrolla a 4°C y a un flujo de 28 ml/hora proporcionado por succión mediante una bomba peristáltica LKB 10.200 (Suecia) conectada a la salida de la columna.

Se recogen fracciones de 0,5 ml mediante un colector de fracciones automático LKB Ultrorac 7.000 conectado a la salida de la bomba peristáltica, determinándose el volumen exacto de elución de cada muestra por el peso del líquido correspondiente.

El volumen vacío o de exclusión ( $V_0$ ) se estima a partir del volumen de elución de una muestra conteniendo azul



dextrano al 0,3%. El volumen total ( $V_t$ ) se determina calibrando la columna vacía con agua destilada.

Las proteínas utilizadas como marcadores, los radios de Stokes considerados y las cantidades aplicadas son: catalasa de hígado bovino, 5,22 nm, 50  $\mu$ g; alcohol deshidrogenasa de levadura, 4,61 nm, 200  $\mu$ g; seroalbúmina bovina, 3,55 nm, 2,4 mg y aldolasa de músculo de conejo, 4,81 nm, 2,4 mg.

La alcohol deshidrogenasa, la catalasa y la glutamato sintasa se localizan por su actividad catalítica, tal como se indica en el apartado II.C, y el azul dextrano, la seroalbúmina y la aldolasa se detectan por su absorbancia a 280 nm.

El radio de Stokes se obtiene procesando los datos obtenidos de la cromatografía según Laurent y Killander (81), representando  $(-\log K_{av})^{1/2}$ , donde  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ , en función de los radios de Stokes correspondientes.

El peso molecular de la glutamato sintasa se estima mediante cromatografía de filtración en gel siguiendo el método de Andrews (6), tanto por filtración convencional como mediante HPLC.

En el primer caso, se utiliza una columna de Sephacryl S-300 Superfine (Farmacia, Suecia) de las mismas características que la descrita para la determinación del radio de Stokes y siguiendo condiciones experimentales idénticas.

Las proteínas utilizadas como marcadores y los pesos moleculares considerados son: catalasa de hígado bovino, 232 kDa; alcohol deshidrogenasa de levadura, 141 kDa; seroalbúmina bovina, 67 kDa y aldolasa de músculo de conejo, 158 kDa.

La filtración en gel mediante HPLC se lleva a cabo empleando una columna Protein-Pak 125, de 7,8 mm x 30 cm, seguida por una Protein-Pak 300 SW, 7,5 mm x 30 cm, colocada en serie (volumen total de 27,6 ml). Sus intervalos de fraccionamiento son de 2 a 80 kDa y de 10 a 400 kDa respectivamente.

El sistema empleado para los análisis consta de los siguientes módulos conectados en serie: una bomba 6000A, un inyector manual U6K directamente conectado a las columnas y un

detector de absorbancia de longitud de onda variable Lambda-Max modelo 481 fijado en 280 nm. Un controlador de gradiente modelo M-720 regula el funcionamiento de la bomba; los datos obtenidos del detector se procesan directamente con la unidad de procesamiento de datos M-730; todo el sistema es de Waters-Millipore (EE.UU.).

La filtración se lleva a cabo en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7, a un flujo constante de 0,4 ml/minuto, generando una presión en columna de aproximadamente 200 psi.

Se inyectan entre 10 y 250  $\mu$ l de muestras conteniendo 5 ó más  $\mu$ g de glutamato sintasa o de cada proteína patrón, después de centrifugarse a 12.000 x g durante 2 minutos.

Las proteínas empleadas como marcadores y sus pesos moleculares son los mismos que para la cromatografía convencional, excepto que en este caso no se utiliza alcohol deshidrogenasa y se añade ovoalbúmina, de 43 kDa. El volumen vacío se determina empleando azul dextrano.

En los dos casos, el peso molecular se obtiene representando la  $K_{av}$ , cuyo valor es  $(V_e - V_o)/(V_t - V_o)$  en función del logaritmo de los pesos moleculares correspondientes.

#### II.E.4. Electroforesis

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

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en placa se realizan en geles de poliacrilamida al 6,25% de acrilamida, según el sistema discontinuo descrito por Jovin *et al.* (75), utilizando un aparato Protean II Slab Cell de Bio-Rad (EE.UU.), o un aparato para doce geles cilíndricos de Shandon.

Los geles se preparan mezclando 2,5 volúmenes de una disolución de acrilamida al 20% y bis-acrilamida al 0,8%, con 1 volumen de tampón Tris-HCl 3 M, pH 8,3, conteniendo TEMED al 0,46% (v/v); 0,5 volúmenes de agua y 4 volúmenes de persulfato amónico al 0,1% preparado inmediatamente antes de su uso. Para geles a concentraciones de acrilamida distintas del 6,25%, se modifica el volumen de la disolución de acrilamida y se corrige el volumen final con agua destilada. Los gases disueltos se eliminan mediante vacío antes de la polimerización, que se realiza

a temperatura ambiente bien entre dos placas de vidrio de 20 x 20 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 1 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante, o bien en cilindros de vidrio (0,5 x 10 cm) llenos hasta aproximadamente 2 cm del extremo superior, cubriéndose el menisco con una capa de agua destilada. Las placas se llenan hasta aproximadamente 16 cm del extremo inferior, cubriéndose el menisco con una capa de 0,5 a 1 cm de agua destilada. Una vez polimerizados, los geles se recubren con una pequeña capa (1-2 cm de altura) de gel de empaquetamiento conteniendo 3,5% de acrilamida en Tris-HCl 0,5 M pH 6,8. En la electroforesis en placa, inmediatamente después se introduce en la parte superior del gel aún no polimerizado un peine de teflón de 15 dientes de 0,65 cm de anchura y 2,8 cm de altura, que se retira una vez polimerizado el gel, para formar los pocillos donde se colocarán las muestras. Una vez aplicadas, las muestras conteniendo 20-40  $\mu$ g de proteína, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01% usado como marcador del frente de electroforesis, se someten, en el caso de las placas, a una intensidad de 30 mA/placa durante la primera hora y 40 mA/placa a continuación, hasta que el colorante alcanza el extremo inferior de la placa (unas 3,5 horas). En el caso de los cilindros, la intensidad es de 2,5 mA/gel durante la primera hora y 4 mA/gel a continuación, hasta que el frente alcance el extremo del cilindro (unas 3 horas). El tampón de electrodo usado es Tris (3,6 g/l)-glicina (15,3 g/l) a pH 8,3.

#### II.E.4.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico

Las electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS se llevan a cabo según el procedimiento descrito por Weber y Osborn (173), usando geles al 7 ó al 5% de acrilamida, utilizando un aparato Protean II Slab Cell de Bio-Rad, o un aparato para doce geles cilíndricos de Shandon (Gran Bretaña).

Para preparar los geles al 7%, se mezclan 11,2 ml de una solución de acrilamida al 20% y bis-acrilamida al 0,8% con 8 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 0,32 ml de una solución

de SDS al 10%; 16  $\mu$ l de TEMED; 10,9 ml de agua destilada y 1,6 ml de persulfato amónico al 1% recién preparado. Para geles a otras concentraciones de acrilamida, se modifica el volumen de la disolución de acrilamida y se corrige el volumen final con agua destilada.

Para la electroforesis en placa, la mezcla, una vez eliminados los gases disueltos en ella, se deja polimerizar a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 20 x 20 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 1 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, EE.UU.). Las placas se llenan hasta unos 16 cm del extremo inferior, cubriéndose el menisco con una capa de 0,5 a 1 cm de agua destilada. Una vez polimerizado, el gel se recubre con una pequeña capa (1-2 cm de altura) de gel de empaquetamiento conteniendo 3,5% de acrilamida y en el que se ha sustituido el tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 por Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.

Para las electroforesis en cilindro, se sigue el procedimiento de montaje descrito en el apartado anterior.

Las proteínas utilizadas como patrones de peso molecular y las cantidades aplicadas son: catalasa de hígado de buey, 6  $\mu$ g por pocillo; tiroglobulina de tiroides de cerdo, 12  $\mu$ g por pocillo; ferritina de bazo de caballo, 12  $\mu$ g por pocillo, preparadas en agua destilada.

Todas las muestras se mezclan con volúmenes iguales de una solución de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, conteniendo SDS al 4% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% (v/v), tras lo cual se calienta a 100°C durante 5 minutos. Una vez enfriadas, se les añade glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%. Se aplican muestras de 10 a 100  $\mu$ l por pocillo y la electroforesis se desarrolla a 4°C. La intensidad inicial es de 16 mA/placa ó 2 mA/cilindro; una vez que el frente ha recorrido el gel de empaquetamiento, la intensidad de la corriente se aumenta hasta 24 mA/placa ó 3-4 mA/cilindro y se mantiene así durante 5 horas (placa) ó 2,5 horas (cilindros). Como tampón de electrodo se emplea Tris (6 g/l)-glicina (28,8 g/l), pH 8,3, conteniendo SDS al 0,1%.

Para la determinación de los pesos moleculares, se representa en ordenadas el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas patrón y en abcisas la movilidad electroforética relativa de cada proteína respecto del frente de electroforesis

( $R_f$ ), obteniéndose una recta patrón.

#### II.E.4.3. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizan tifiéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R al 0,25% en 9% (v/v) de ácido acético y 45% (v/v) de metanol en agua. Tras varias horas de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavan repetidas veces en una solución de metanol al 5% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) en agua, tras lo cual las proteínas se visualizan como bandas de color azul. Los geles una vez teñidos se conservan en ácido acético al 7%.

#### II.E.4.4. Tinción de actividad glutamato sintasa en geles de poliacrilamida

Para ello, una vez finalizada la electroforesis, los geles se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos en una solución de tampón fosfato potásico pH 7,5, 50 mM, suplementado con metilviológeno, 10 mM y ditionito sódico, 50 mg/ml. Posteriormente se transfieren a una mezcla de glutamina 5 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 1 mM y aminooxiacetato 5 mM en tampón fosfato potásico pH 7,5, 50 mM y se incuban 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los geles se transfieren a una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,25 % en agua donde se mantienen durante varias horas, hasta que toman un color rojo opaco, salvo las zonas con actividad, que presentan un color rojo translúcido. Los geles se pueden conservar varias semanas en una solución de ácido acético al 7% en agua.

#### II.E.4.5. Inmunolectroforesis en presencia de detergente

A 18 ml de una solución de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 37,5 mM; glicina 100 mM, pH 8,6, fundida y mantenida a 50°C, se le añaden 75  $\mu$ l de antisuero anti-GS (apartado II.B.5) y detergente Triton X-100 hasta un 0,1 % (v/v). Seguidamente, se extiende sobre una placa (11,5 x 11,5 cm) precalentada a 30-40°C. Una vez gelificada la agarosa, se practican en uno de

los extremos pocillos de 4 mm de diámetro a unos 8 mm del borde de la placa en el lado correspondiente al polo negativo.

Las muestras se incuban 20 minutos a 4°C en presencia de Triton X-100 al 1% (v/v), tras lo cual se aplica 10 µl a cada pocillo.

La electroforesis se lleva a cabo en un sistema de inmunolectroforesis FBE-3000 de Pharmacia (Suecia), a 10 V/cm durante una noche. El tampón empleado es Tris-HCl 37,5 mM, glicina 100 mM, pH 8,6, suplementado con 0,1% (v/v) de Triton X-100. Una vez finalizada, las placas se someten a dos ciclos de lavado con PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM) y secado en papel de filtro, con un último secado al aire. Finalmente, se tiñen durante 10 minutos como se indica en el apartado II.E.4.3.

#### II.E.5. Determinación de absorbancias y espectros de absorción

Las determinaciones colorimétricas y las cinéticas enzimáticas se realizan en espectrofotómetros Pye-Unicam (Gran Bretaña) modelo SP8-100, dotados de salida digital y registrador incorporado.

Los espectros de absorción de la glutamato sintasa purificada se realizan a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman (EE.UU.) modelo DU-7, registrándose automáticamente los datos con un ordenador IBM PC XT.

En los otros casos se utiliza un espectrofotómetro Aminco-Chance (EE.UU.) modelo DW-2a de doble longitud de onda. La anchura de banda normalmente utilizada es de 1 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

#### II.E.6. Concentración de glutamato sintasa

Para la concentración de las soluciones diluídas de proteína obtenidas tras el último paso de purificación, se emplea uno de los métodos siguientes:

##### II.E.6.1. Ultrafiltración

La concentración de proteínas se realiza a 4°C en una

célula de ultrafiltración con agitación Amicon (EE.UU.) modelo 52, de 50 ml de capacidad, empleando membranas Diaflo tipo PM-10 ó PM-30 de 47 mm de diámetro, que retienen compuestos de peso molecular superior a 10 y 30 kDa, respectivamente. Para forzar el paso de líquido a través de la membrana, se aplica dinitrógeno a una presión de 0,3-0,5 Kg/cm<sup>2</sup>.

#### II.E.6.2. Concentración por diálisis

La solución de proteína diluída (10 a 20 ml) se dializa en tripas de celulosa regenerada Visking (Serva, R.F.A.) de diámetro de poro medio de 24 A y límite de exclusión 8 a 15 kDa, frente a 10 volúmenes de tampón estándar suplementado con un 20% de polietilenglicol 20.000. Después de unas horas a 4°C y agitación suave, el volumen queda reducido a menos de 1 ml. La diálisis se continúa entonces durante 12 horas frente a 1 litro de tampón estándar desprovisto de polietilenglicol, con el fin de eliminar las impurezas de bajo peso molecular que pudiera llevar este compuesto. La suspensión concentrada resultante se extrae cuidadosamente de la tripa con una jeringa, constituyendo la fracción concentrada de glutamato sintasa purificada.

#### II.E.7. Eliminación de sales y moléculas pequeñas

Las sales se eliminan de los extractos enzimáticos por diálisis utilizando tubos de celulosa regenerada Visking (Serva, R.F.A.) de diámetro de poro medio de 24 A y límite de exclusión 8 a 15 kDa. Las membranas se lavan exhaustivamente con agua destilada antes de su uso.

En los casos en los que las muestras son demasiado pequeñas o cuando el cambio de tampón tiene que realizarse de forma rápida, las moléculas de bajo peso molecular se eliminan por filtración forzada a través de Sephadex G-25 siguiendo el método de Orly y Selinger descrito por Penefsky (117): jeringas de plástico de 1 ó 2 ml en cuyo extremo inferior se ha colocado un círculo de papel de filtro se llenan con Sephadex G-25 hinchado y se equilibran con varios volúmenes del tampón en el que se quiere dejar la muestra. Las jeringas (medidas en tubos de centrifuga) se centrifugan a 900 r.p.m. durante 2 minutos en

centrífuga de mesa para eliminar el exceso de tampón en el gel. Un volumen de muestra diez a veinte veces menor al del gel empaquetado se aplica sobre la superficie del lecho y se centrifuga de nuevo a 900 r.p.m. durante 2 minutos, recogién dose en el tubo de centrífuga la muestra ya filtrada con sólo un 10% de incremento de volumen.

#### II.E.8. Medidas del pH

El pH de las disoluciones se determina con pH-metros Methrom Herisau modelo 654 ó Radiometer modelo PHM82 (Dinamarca), ambos provistos de escala digital.

### II.F. REACTIVOS

#### II.F.1. Procedencia de compuestos químicos y bioquímicos

Los siguientes compuestos: azul de Coomassie; nucleótidos de flavina; nucleótidos de adenina; Tris; Tricina; Triton X-100; OPA; EDTA; N-etilmaleimida; p-hidroximercuribenzoato (p-HMB); 1,2-ciclohexanodiona; piridoxal-5-fosfato; patrones de aminoácidos para HPLC; L-glutamina; ácido L-glutámico;  $\gamma$ -bencil-L-glutamato; sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno; y las proteínas: citocromo c; seroalbúmina bovina; ovoalbúmina; alcohol deshidrogenasa; catalasa; y lisozima se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (EE.UU.). El azul dextrano 2000; DEAE-Sephadex A-25; Sephadex G-25 Fine; Sephacryl S-300 Superfine; y los juegos de patrones para determinación de pesos moleculares por electroforesis y filtración en gel, de Pharmacia (Suecia). El NAD(P)<sup>+</sup> y NAD(P)H, de Boehringer (R.F.A.). La DEAE-celulosa DE-52 de Whatman (Gran Bretaña). El DCMU; DCCD; FCCP; TEMED; acrilamida; metilén-bisacrilamida; MV y BV de Serva (R.F.A.). El 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-P,P'-disulfonato (ferrocina) de Aldrich (R.F.A.). El nitrato potásico, fosfato dipotásico y bicarbonato sódico empleados en los cultivos a gran escala fueron de grado analítico y suministrados por Panreac (España). El resto de los compuestos utilizados eran de grado analítico, procedentes de Merck (R.F.A.).



El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA (España). Los gases utilizados, anhídrido carbónico, nitrógeno y argón fueron adquiridos a la S.E.O. (España).

### III. RESULTADOS

### III.A. DETERMINACION DE ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACION DEL AMONIO EN CIANOBACTERIAS . in situ E in vitro. MEDIANTE HPLC

Las reacciones de incorporación de amonio a esqueletos carbonados, catalizadas, en organismos fotosintéticos, por las enzimas glutamina sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa, dan lugar a la formación de glutamina o glutamato como productos primarios (154). La determinación directa de la actividad de estas enzimas exige, por tanto, la cuantificación de estos productos en presencia de los sustratos de la reacción que se encuentran a concentraciones dos órdenes de magnitud superiores. La gran similitud estructural existente entre sustratos y productos, fundamentalmente entre glutamina y glutamato, obliga a una separación de ambos previa a su cuantificación. Tradicionalmente, esta separación se venía haciendo por cromatografía convencional de intercambio aniónico (fig. 2A). Los principales inconvenientes de este método son el bajo nivel de sensibilidad y la inversión de tiempo que requiere.

En nuestro trabajo, hemos empleado cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa como método de separación de dichos aminoácidos, aplicable a los ensayos de las distintas enzimas formadoras de glutamato o glutamina en cianobacterias, basado en el descrito por Martin *et al.* (99).

El método implica, tanto para la separación de los aminoácidos como para su detección, un paso previo de derivatización con o-ftaldialdehído (OPA) a pH alcalino y en presencia de un grupo tiólico ( $\beta$ -mercaptoetanol) para formar el derivado fluorescente 1-alquiltio-alquilisoindol de cada aminoácido cuyos máximos de excitación y emisión son respectivamente 338 nm y 425 nm (89). El carácter hidrofóbico de los derivados así formados favorece su interacción con la matriz de fase reversa, siendo la movilidad de los distintos OPA-derivados dependiente de la polaridad de sus restos aminoácidos. Esta es, en el caso de glutamato y glutamina, lo suficientemente distinta como para permitir una separación completa con elución isocrática, sin

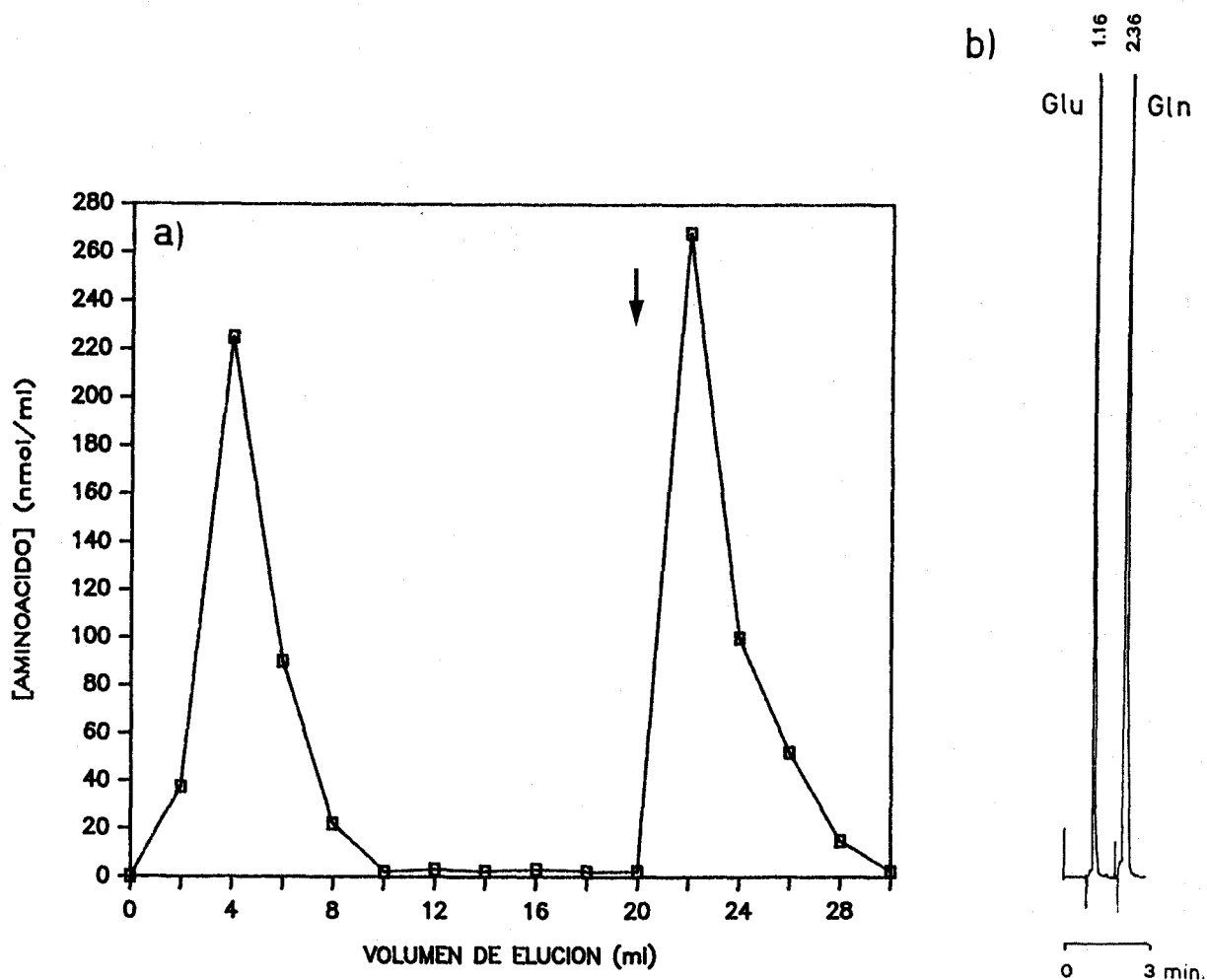


Figura 2: Separación de glutamato y glutamina por cromatografía convencional de intercambio iónico o por cromatografía de adsorción mediante HPLC

a) 1 ml de muestra conteniendo 1  $\mu\text{mol}$  de glutamato y 1  $\mu\text{mol}$  de glutamina se aplica a una columna (0,7 x 4 cm) empaquetada con 2 ml de resina AG1-X8.Cl<sup>-</sup> equilibrada con agua destilada. Seguidamente se lava con 20 ml de agua destilada y a continuación se eluye el glutamato de la columna lavando con NaCl 0,4 M (flecha). Se toman fracciones de 2 ml cuyo contenido en aminoácido se analiza siguiendo el método de Plummer (120).

b) Muestras conteniendo 300 pmol de cada aminoácido se tratan y cromatografían como se indica en los apartados II.D.1.1-3.

necesidad de variar la polaridad del solvente a lo largo de la cromatografía. En nuestras condiciones de elución (apartado II.D.1.3) conseguimos una resolución total de los picos correspondientes a glutamato y glutamina (fig. 2B), con una diferencia entre sus respectivos tiempos de retención de 1 minuto 6 s a 2 minutos, dependiendo del flujo, tipo de inyector empleado y estado de uso de la columna. No obstante, dentro de un mismo grupo de análisis, los tiempos de retención resultan muy repetitivos ( $\pm 0,2$  s), lo que permite una perfecta identificación de cada uno de los componentes eluidos. El tiempo total de cada ciclo, incluyendo el lavado de la columna, no supera los 4 minutos (inyección manual) ó 13 min. (inyección automática) a un flujo de 1ml/min.

La reacción de derivatización de glutamato y glutamina con OPA sigue una cinética no lineal (fig. 3), diferente para cada aminoácido. El tiempo estándar de derivatización ha sido fijado en 90 s, en un compromiso entre tiempo invertido en cada análisis y formación del derivado fluorescente.

La cinética de derivatización puede seguirse espectrofotométricamente a 335 nm, lo que nos ha permitido detectar con facilidad las diferencias existentes, a veces, entre distintos lotes de OPA. Sin embargo, esta detección resulta varios órdenes de magnitud menos sensible que el método fluorimétrico.

El método puede aplicarse eficientemente entre valores de 10 pmol y 1 nmol de cada aminoácido por análisis, siendo la respuesta del detector lineal y muy repetitiva entre estos valores (fig. 4), decayendo en niveles superiores (probablemente por saturación de la señal del detector).

Los aminoácidos se cuantifican automáticamente por integración de los picos, empleando como referencia los valores de área de pico obtenidos con soluciones patrón similarmente tratadas e inyectadas cada cierto número de análisis.

Este método ha sido directamente aplicado al análisis de las actividades fisiológicas de las enzimas glutamina sintasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa en cianobacterias.

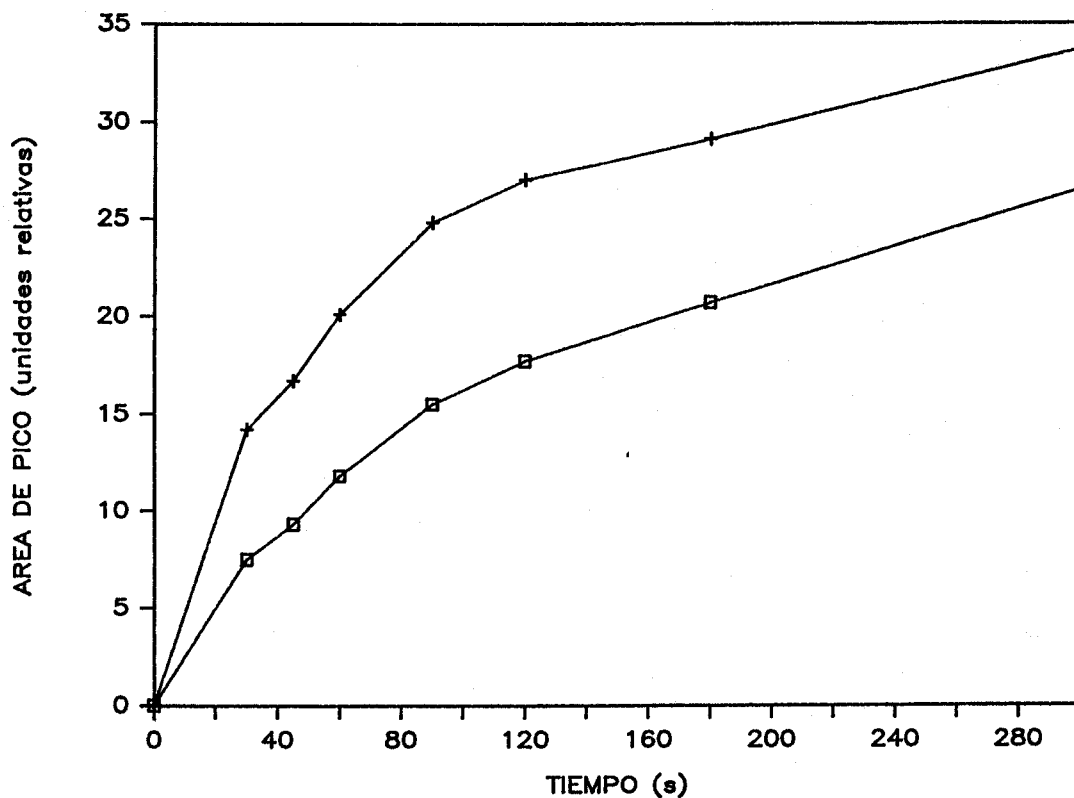


Figura 3: Cinética de la reacción de derivatización de glutamato y glutamina con o-ftaldialdehído

La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 400  $\mu\text{l}$ : tampón borato sódico, pH 10, 108  $\mu\text{mol}$ ; o-ftaldialdehído, 12  $\mu\text{mol}$ ; metanol, 12  $\mu\text{l}$ ;  $\beta$ -mercaptoetanol, 12  $\mu\text{l}$ ; HEPES-NaOH, 5  $\mu\text{mol}$ ; glutamina, 4  $\mu\text{mol}$ ; glutamato, 4  $\mu\text{mol}$ , a 22°C. La reacción se inicia al añadir los aminoácidos disueltos en tampón HEPES pH 7. Se toman muestras alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  que se inyectan a los tiempos indicados.

Las condiciones de la cromatografía son las que se indican en el apartado II.D.1.3.

(+) glutamina, (o) glutamato.

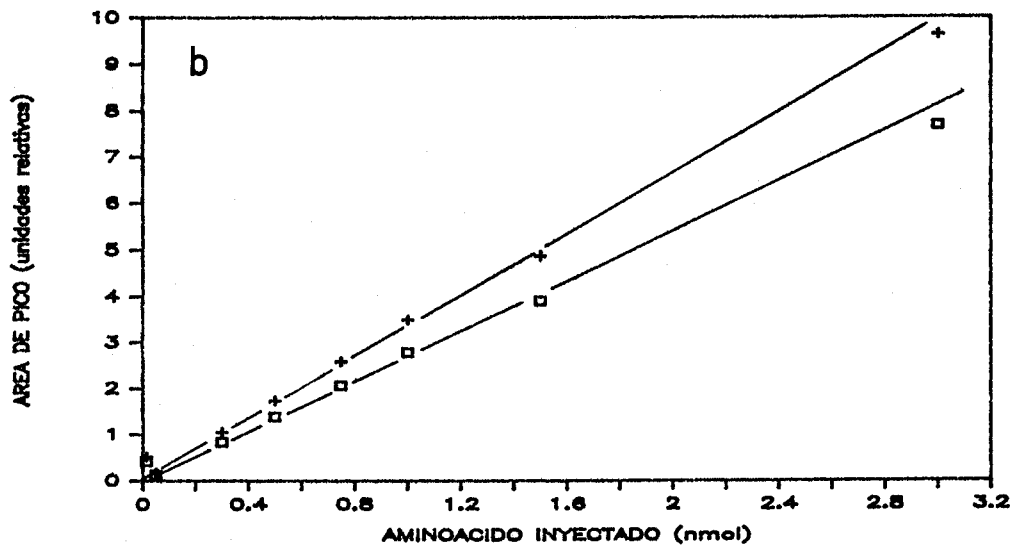
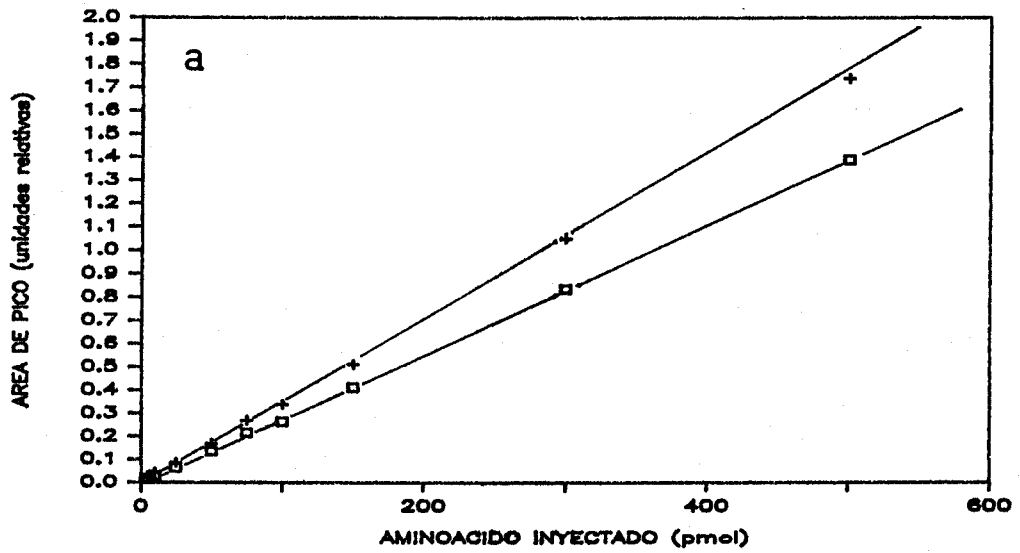


Figura 4: Cuantificación, mediante HPLC, de distintas concentraciones de glutamato y glutamina

Mezclas conteniendo ambos aminoácidos a las concentraciones que se indican se derivatizan y cromatografían como se describe en los apartados II.D.1.1-3.

(+) glutamina, (o) glutamato.

### II.A.1. Glutamato sintasa (GOGAT)

La detección de actividad glutamato sintasa se lleva a cabo midiendo el glutamato producido a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato, con ferredoxina o metilviológeno reducidos como donadores de electrones, según la reacción [3] (apartado I.A). Una vez detenida la reacción por adición de ácido clorhídrico (apartados II.C.1.1 y 2), los aminoácidos se derivatizan, separan, y cuantifican por HPLC según se ha descrito anteriormente.

El control (blanco) del ensayo es una muestra tomada a tiempo 0 después de la adición de ditionito. Este control permite descontar el glutamato presente en la muestra a  $t=0$  y corregir posibles errores en la preparación de los ensayos, toma de muestras y diluciones posteriores, del siguiente modo:

La concentración total de aminoácido a tiempo inicial ( $A_0$ ) es la suma de la concentración de glutamato inicial ( $Glu_0$ ) y de la concentración de glutamina inicial ( $Gln_0$ ); la concentración de aminoácido total una vez transcurrido el tiempo de ensayo  $t$  ( $A_t$ ) corresponde a la concentración de glutamato presente en este tiempo ( $Glu_t$ ) más la concentración de glutamina remanente. Dado que el glutamato producido proviene a partes iguales de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato, podemos afirmar que  $A_t$  debe ser igual a  $A_0 + 1/2 (Glu_t - Glu_0)$ , ya que

$$A_{t=0} \longrightarrow \text{Aminoácido total } A_0 = Gln_0 + Glu_0$$

$$A_{t=t} \longrightarrow \text{Aminoácido total } A_t = Gln_t + Glu_t$$

$$\text{como } Glu_t = Glu_0 + Glu_{\text{formado}}$$

y  $Gln_t = Gln_0 - 1/2 Glu_{\text{formado}}$ , sustituyendo tendremos:

$$A_t = Gln_0 - 1/2 Glu_f + Glu_0 + Glu_f = Gln_0 + Glu_0 + 1/2 Glu_f$$

$$A_t = A_0 + 1/2 Glu_f = \underline{A_0 + 1/2 (Glu_t - Glu_0)}$$



ya que el glutamato formado en el transcurso de la reacción será:

$$\text{Glu}_f = \text{Glu}_t - \text{Glu}_o$$

La corrección se lleva a cabo multiplicando el  $\text{Glu}_t$  por un factor  $F$ , idealmente igual a 1, cuyo valor es:

$$F = \frac{A_o + 1/2 (\text{Glu}_t - \text{Glu}_o)}{A_t}$$

en el que cada parámetro es cuantificado por el aparato. Por tanto, el

$$\text{Glu formado} = \text{Glu}_t \frac{[ A_o + 1/2(\text{Glu}_t - \text{Glu}_o) ]}{A_t} - \text{Glu}_o$$

El  $\text{Glu}_o$  no se corrige, es decir, se asume para él un factor de corrección igual a 1.

Este factor nos permite corregir errores en el volumen de inyección y tiempo de derivatización, así como, en parte, errores en las diluciones tras el ensayo.

La unidad de actividad glutamato sintasa se define como sigue:

1 U = 1  $\mu\text{mol}$  de glutamato producido por minuto a 30°C en las condiciones del ensayo estándar.

El método es igualmente aplicable a la determinación de la actividad in situ, imprescindible para seguir cambios en los niveles fisiológicos de enzima en distintas condiciones de crecimiento. El ensayo in situ se lleva a cabo haciendo las células permeables a los sustratos. La tabla I muestra los valores de actividad obtenidos empleando distintos agentes permeabilizantes: solvente orgánico (tolueno), detergente iónico (MTA) y no iónico (Triton X-100). Se puede apreciar que en todos los casos la repetitividad del ensayo es alta. Para los ensayos rutinarios de glutamato sintasa, hemos elegido tolueno como agente permeabilizante por su eficacia y buena reproducibilidad (los detergentes, especialmente los no iónicos como el Triton,

TABLA I

Efecto de varios agentes permeabilizantes sobre los ensayos in situ de las actividades glutamato sintasa y glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 y de la glutamato deshidrogenasa de Synechocystis 6803

ENZIMA	AGENTE PERMEABILIZANTE	ACTIVIDAD MEDIA (U/mg clorofila)
GOGAT	MTA	0,087 ( $\pm$ )0,007
GOGAT	Tolueno	1,554 ( $\pm$ )0,038
GOGAT	Triton X-100	1,701 ( $\pm$ )0,029
GS biosintét.	MTA	1,663 ( $\pm$ )0,03
GS "	Tolueno	0,005 ( $\pm$ )0,007
GS "	Triton X-100	1,167 ( $\pm$ )0,058
GS transfer. (1)	MTA	43,43 ( $\pm$ )0,652
GS " (2)	Tolueno	1,71 ( $\pm$ )0,26
GS " (2)	Triton X-100	22,2 ( $\pm$ )0,36
GDH	MTA	0,215 ( $\pm$ )0,011

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en los apartados II.C.1-3 con células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno. Cuando el agente permeabilizante empleado es un detergente, la suspensión se agita durante 10 s antes de iniciar el ensayo, y cuando es tolueno, se agita durante 1 minuto.

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se ensaya con 10  $\mu$ g clorofila/ml ensayo.

N=5, salvo en (1): N=7 y (2): N=4.

presentan el inconveniente de su variabilidad entre lotes distintos, así como de sufrir modificaciones con el tiempo de almacenamiento (60). El bajo nivel de actividad obtenido con MTA es difícil de explicar, a no ser por una interferencia directa con el ensayo, ya que este detergente funciona perfectamente para la determinación in situ de las actividades glutamina sintetasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa en esta misma cianobacteria (63).

### II.A.2. Glutamina sintetasa (GS)

Los niveles de glutamina sintetasa se pueden determinar fácilmente como actividad transferasa por el método de Shapiro y Stadtman (144), basado en la capacidad de la enzima de catalizar una reacción de transferencia (177), produciendo  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato medible espectrofotométricamente a partir de glutamina, hidroxilamina, ADP y arseniato en presencia de cationes divalentes (reacción [5], apartado I.B). Pese a su sencillez, este ensayo tiene el inconveniente de no representar la actividad fisiológica real de la enzima (reacción [4], apartado I.B); en cualquier estudio del efecto de distintas condiciones y compuestos sobre la actividad, resulta necesario comprobar si los cambios detectados en la actividad transferasa se corresponden realmente con alteraciones en la actividad biosintética de la enzima, ya que en muchos estudios (42, 70, 77), no se observa un paralelismo estricto entre las respuestas de estas dos actividades a distintos tratamientos.

La tabla II muestra la caracterización del ensayo biosintético de la actividad glutamina sintetasa llevado a cabo en nuestras condiciones y analizado por HPLC (como se describe en el apartado II.C.2.2), que demuestra la existencia de una actividad biosintética capaz de producir glutamina a expensas de amonio, glutamato y ATP, y que requiere la presencia de iones  $Mg^{++}$ .

La figura 5 compara la cinética de las actividades biosintética y transferasa determinadas in situ durante 40

TABLA II

Caracterización de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 determinada in situ en células permeabilizadas

---

SISTEMA	ACTIVIDAD (U/mg clorofila)
COMPLETO	2,150
menos AMONIO	0,030
menos GLUTAMATO	0,000
menos MAGNESIO	0,080
menos ATP	0,005

---

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.2.2 (15  $\mu$ g clorofila/ml ensayo), omitiendo en la mezcla de reacción el compuesto indicado en cada caso.

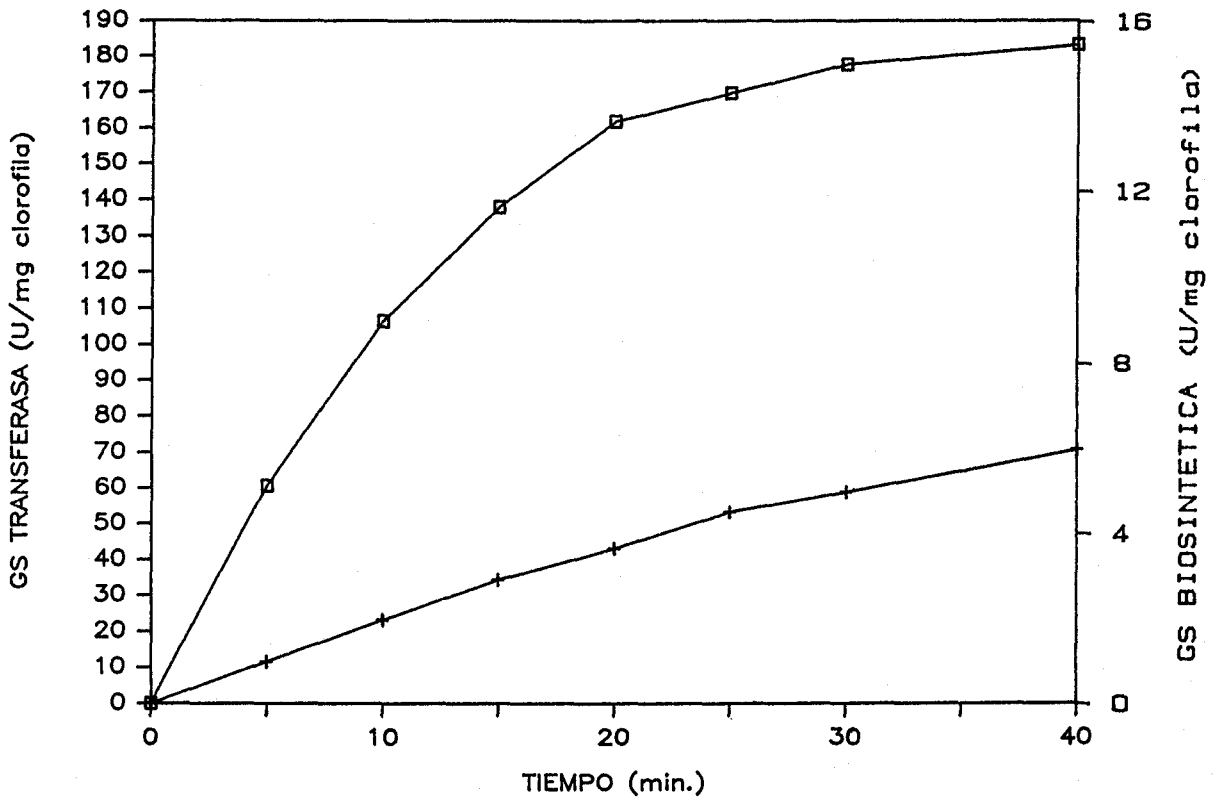


Figura 5: Cinética de las actividades biosintética y transferasa determinadas in situ en células permeabilizadas de Synechococcus 6301

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.2 pero con 3 ml de volumen final de ensayo, tomando fracciones alícuotas para su análisis a los tiempos indicados. 25 µg clorofila/ml de ensayo.

(+) biosintética, (□) transferasa.

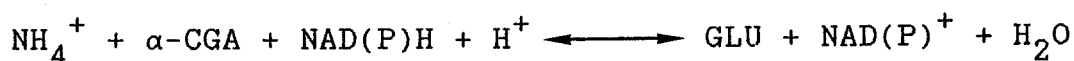
minutos. Se puede apreciar que la actividad biosintética permanece constante a lo largo de un mayor espacio de tiempo. La relación de actividad en la zona lineal de ambas cinéticas es aproximadamente de 1 a 20, valor este bastante repetitivo en las distintas condiciones ensayadas a lo largo de nuestro trabajo.

La tabla I presenta los valores de actividad biosintética de la glutamina sintetasa determinados in situ empleando distintos agentes permeabilizantes, así como una estimación del grado de fiabilidad de los ensayos. Hay que hacer notar el que se obtenga una actividad casi nula con tolueno como permeabilizante. El empleo de este compuesto en ensayos in situ en cianobacterias unicelulares ha dado, sin embargo, buenos resultados tanto con enzimas solubles de localización citoplásmica (glutamato sintasa, este trabajo) como unidas a membranas (nitrato reductasa, 26).

Vistos los resultados anteriores, elegimos MTA como agente permeabilizante para el ensayo in situ de la actividad glutamina sintetasa.

### II.A.3. Glutamato deshidrogenasa (GDH)

La enzima glutamato deshidrogenasa lleva a cabo la siguiente reacción:



La actividad es fácil de determinar en extractos diluïdos libres de células siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de NAD(P)H. Por el contrario, la determinación espectrofotométrica de actividades in situ presenta muchos problemas en cianobacterias (interferencia de pigmentos en la detección, turbidez, blancos muy altos, etc...)

El método de análisis mediante HPLC descrito en los apartados anteriores es igualmente aplicable a la detección de los niveles de actividad de esta enzima, tanto in situ como in vitro.

La tabla III muestra la caracterización de la

TABLA III

Caracterización de la actividad glutamato deshidrogenasa de Synechocystis 6803

SISTEMA	NADPH OXIDADO (nmol)	GLUTAMATO FORMADO (nmol)
COMPLETO	32,0	31,2
menos NADPH	-	0,6
menos $\alpha$ -CGA	0,8	0,0
menos AMONIO	1,3	0,0
COMPLETO (enzima hervida 5 min.)	1,3	0,2

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.4. con una preparación de enzima parcialmente purificada (41), omitiendo de la mezcla de reacción el compuesto indicado en cada caso.

actividad glutamato deshidrogenasa de una preparación purificada a partir de Synechocystis 6803 (41), y medida tanto espectrofotométricamente, siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm, como determinando el glutamato producido en la reacción mediante HPLC. Se puede observar que existe una buena correlación entre la cantidad de NADPH oxidado y la de glutamato aparecido, pudiéndose afirmar que se trata de una verdadera actividad glutamato deshidrogenasa, capaz de producir glutamato incorporando amonio al  $\alpha$ -cetoglutarato a expensas del poder reductor del NADPH.

Por otra parte, la determinación de esta actividad en extractos siguiendo la desaparición de NADPH presenta el inconveniente de la inespecificidad de este compuesto como agente reductor, no pudiendo descartarse en estos ensayos el posible funcionamiento secuencial de otras enzimas presentes. La presencia de otras deshidrogenasas en el extracto, de actividad variable según la edad del cultivo, supone igualmente una interferencia clara en este método de ensayo. Por ello resulta siempre ventajoso el poder determinar esta actividad enzimática siguiendo directamente la formación del producto de la reacción tal como se ha indicado anteriormente.

### III.B. ESTUDIOS SOBRE LA GLUTAMATO SINTASA DE *Synechococcus* 6301

#### III.B.1 Estudios sobre la actividad glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 realizados in situ

##### III.B.1.1. Caracterización de la actividad glutamato sintasa

La presencia de actividad glutamato sintasa en preparaciones no purificadas (extractos crudos) o en células enteras de cualquier organismo, detectada siguiendo la formación de glutamato debe determinarse, en general, con ciertas precauciones;



TABLA IV

Caracterización de la actividad glutamato sintasa determinada in situ en células de Synechococcus 6301

SISTEMA	% DE ACTIVIDAD
COMPLETO	100 <sup>(1)</sup>
menos GLUTAMINA	1,5
menos $\alpha$ -CETOGLUTARATO	0,0
menos METILVIOLOGENO	11
menos DITIONITO	5
menos AMINOOXIACETATO	101
menos CELULAS	0

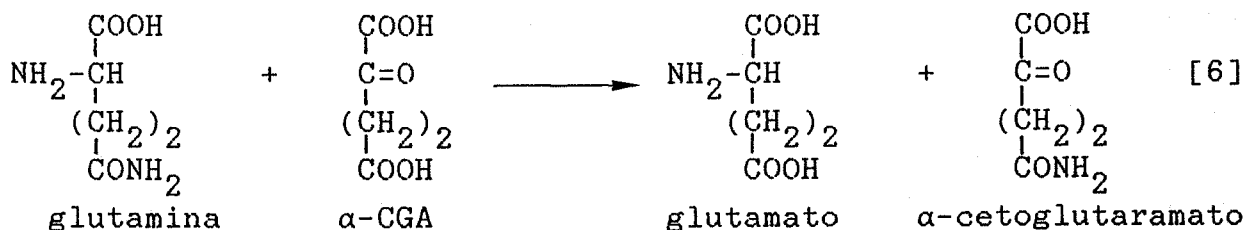
Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.1.1 , salvo que se emplean 35  $\mu$ g clorofila/ml ensayo y que se omite de la mezcla de reacción el compuesto indicado en cada caso.

(1) El 100% de actividad corresponde a 1,6 U/mg clorofila.

los ensayos pueden verse afectados fácilmente por la posible presencia en las preparaciones de otras actividades formadoras de glutamato, principalmente glutamato deshidrogenasa, glutaminasa o transaminasas, actuando separada o conjuntamente, (7, 55, 59, 122).

La tabla IV muestra las características de la reacción catalizada por la glutamato sintasa, ensayada en células de Synechococcus 6301 cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno y permeabilizadas con tolueno como se indica en el apartado II.C.1.1. Se observa que la actividad, aproximadamente 1,6 U/mg clorofila (equivalente a unas 50 mU/mg proteína), es absolutamente dependiente de poder reductor (sistema artificial metilviológico/ditionito) y de los sustratos glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato. La ligera actividad (aproximadamente 10%) obtenida cuando se omite el transportador metilviológico de la mezcla de ensayo es probablemente debida a la reducción directa del transportador fisiológico de electrones ferredoxina, ciertamente presente en las preparaciones celulares, y concuerda con los resultados obtenidos en extractos de cianobacterias filamentosas (84) y de Lemna minor (126). Cuando se omite el tratamiento permeabilizante de las células, no se detecta formación alguna de glutamato.

Hay que destacar el nulo efecto que parece producir en estas condiciones el inhibidor de transaminasas aminooxiacetato (68, 128), empleado para evitar la posible transaminación del glutamato formado como consecuencia de la reacción de la glutamato sintasa, y para prevenir el funcionamiento, independiente de poder reductor, de alguna transaminasa capaz de rendir glutamato y  $\alpha$ -cetoglutaramato a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato (reacción [6]), actividad detectada en extractos de A. cylindrica (161) y que podría interferir en el ensayo.



Otra interferencia posible en el ensayo es la presencia de actividad glutaminasa, que produciría glutamato y amonio a partir de glutamina (reacción [7]), siendo esta actividad totalmente independiente de poder reductor:



La tabla IV muestra cómo la producción de glutamato en células permeabilizadas de Synechococcus 6301 requiere, sin embargo, un donador de electrones y la presencia del segundo sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato. Por otra parte, observaciones de Lea y Miflin en Chlorella (83), parecen indicar que el ditionito presente en la mezcla de reacción impediría la actuación de una glutaminasa.

Nuestros resultados apoyan la ausencia en estas preparaciones de cantidades significativas de transaminasas dependientes de glutamina, o de actividad glutaminasa, contrariamente a lo descrito en otras cianobacterias (55, 59, 84, 105, 122, 161) y algas verdes (83).

Podemos afirmar, por tanto, que la aparición de glutamato dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamina y agente reductor en Synechococcus 6301 se debe exclusivamente a la actuación de una actividad glutamato sintasa.

### III.B.1.2. Donadores de electrones de la glutamato sintasa ensayada in vitro

Desde la detección por primera vez de una actividad glutamato sintasa en bacterias (160), se han descrito dos tipos de glutamato sintasas atendiendo a su donador de electrones: glutamato sintasa dependiente de piridín nucleótidos (NAD(P)H) E.C.1.4.1.13 y glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, E.C.1.4.7.1. La primera se encuentra tanto en organismos no fotosintéticos como en algunos fotosintéticos. La segunda está presente en algas verdes y plantas superiores, y ha sido la única detectada hasta el momento en cianobacterias (154).

La tabla V compara los valores de actividad glutamato

TABLA V

Donadores de electrones de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

DONADOR DE ELECTRONES	CONCENTRACION (mM)	ACTIVIDAD (%)
FERREDOXINA + DITIONITO	0,01 12	100
DITIONITO	12	19
METILVIOLOGENO + DITIONITO	0,25 12	40
BENCILVIOLOGENO + DITIONITO	0,25 12	0
NADPH <sup>(1)</sup>	1,5	21
NADH <sup>(1)</sup>	1,5	0

180 mg (peso húmedo) de células se resuspenden en 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, y DTE 0,2 mM se tratan con ultrasonidos durante 3,5 minutos a 4°C y se centrifugan a 10.000 x g durante 15 minutos. Del sobrenadante obtenido se ensayan 300 µl como se indica en el apartado II.C.1.2, salvo que el metilviológeno y el ditionito se sustituyen por el donador de electrones indicado en cada caso. El 100% corresponde a 5 mU/ensayo.

(1) El ensayo se inicia por adición de NAD(P)H

sintasa (aparición de glutamato dependiente de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato) obtenidos en extractos libres de células de Synechococcus 6301 empleando distintos donadores de electrones. Queda patente que el extracto crudo contiene una actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, siendo el transportador artificial de electrones metilviológeno mucho menos eficiente donando electrones a la enzima en extracto crudo. Como en el caso de las células permeabilizadas, la actividad remanente en ausencia de ferredoxina añadida o metilviológeno se debe probablemente a la ferredoxina endógena presente en los extractos. Cuando extractos crudos de Synechococcus 6301 se someten a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y se determina la actividad a lo largo de todo el proceso empleando metilviológeno como donador de electrones, el total de actividad obtenida al eluir con un gradiente de NaCl no supera un 25% de la actividad total aplicada en la columna, observándose dos picos (fig. 6). Uno de ellos (90% del total eluido) se eluye a 0,25 M de NaCl, coincidiendo este valor con el del pico único de actividad que se obtiene cuando la actividad del eluato se determina empleando ferredoxina como donador de electrones en los ensayos (fig. 13). El segundo pico sólo representa un 10% de la actividad eluida y su localización en el gradiente coincide con la de la ferredoxina (fracciones 29 y 30), detectada por su color rojizo característico. Dado que este segundo pico no se detecta cuando se emplea ferredoxina en los ensayos, y que en esos casos se recupera hasta un 80% de la actividad tras la cromatografía, concluimos que la actividad metilviológeno-glutamato sintasa detectada en el extracto es en realidad actividad ferredoxina-glutamato sintasa, y que sólo al separarse la ferredoxina en la cromatografía se pone de manifiesto la baja eficiencia del metilviológeno como donador de electrones de la glutamato sintasa (ver tabla XVII). Como consecuencia de ello, se obtiene un pico de actividad cuya área es sólo un 20% de la que resultaría empleando ferredoxina en los ensayos, correspondiendo pues el segundo pico a la cola de actividad que se obtendría en este caso, sobrevalorada por coincidir con la ferredoxina eluida de la columna.

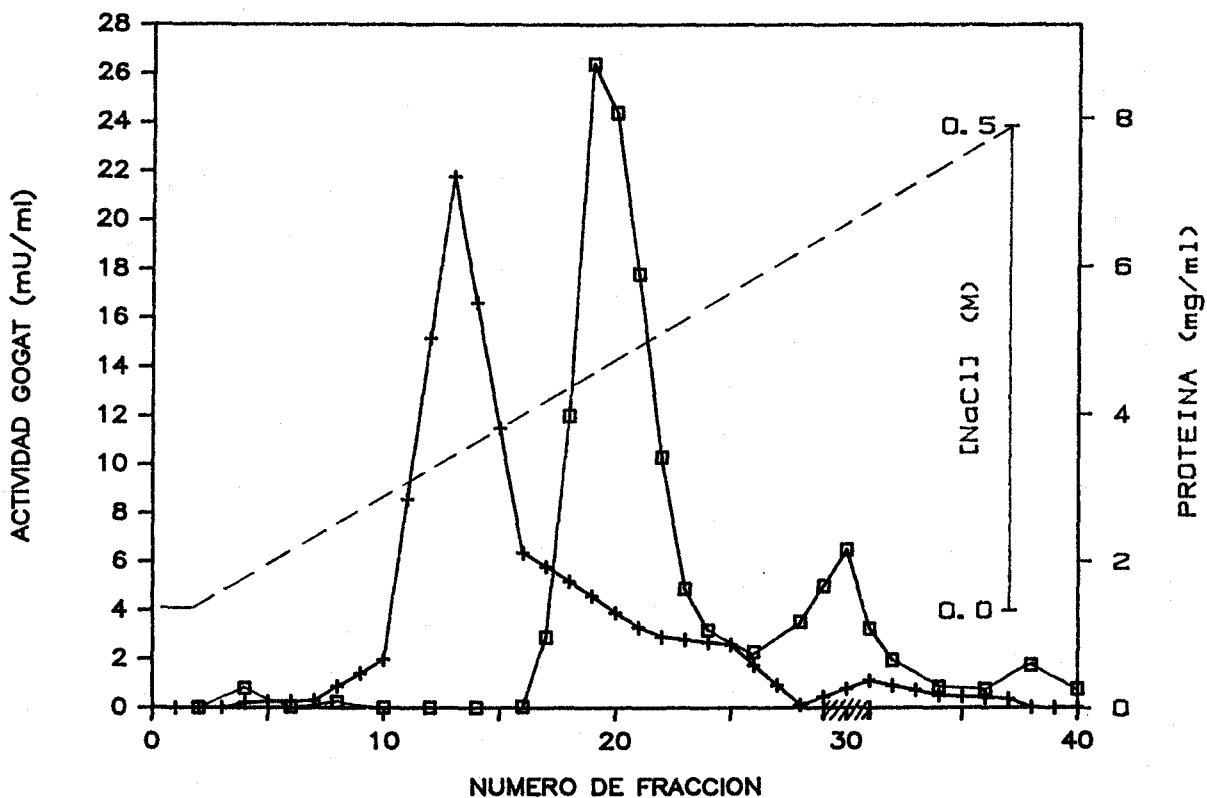


Figura 6: Perfil de elución de la glutamato sintasa ensayada con metilviológeno, en una columna de DEAE-celulosa DE-52

A una columna (1,8 x 11,5 cm) equilibrada en tampón A se le aplica una muestra del sobrenadante resultante tras un fraccionamiento con etanol al 60% (2 U). Trás lavar con 20 ml de tampón A, se aplica un gradiente de 160 ml de NaCl de 0 a 0,5 M en tampón A, recogándose fracciones de 4,2 ml.

La actividad se ensaya en todos los casos con 0,25 mM de metilviológeno en vez de ferredoxina (apartado II.C.1.2).

La ferredoxina, reconocible por su color rojizo, se eluye en las fracciones 29 y 30.

(o) actividad glutamato sintasa; (+) proteína

Igualmente, la actividad obtenida con NADPH como donador de electrones es probablemente el resultado de la presencia en los extractos de Fd-NADP-oxidoreductasa, específica para el NADPH y descrita en Synechococcus 6301 (95), que reduciría ferredoxina a partir del NADPH. Esta enzima es la responsable de la aparente actividad NAD(P)H-nitrato reductasa descrita en esta cianobacteria (58), como se demuestra en (26), y, probablemente, también la responsable de la formación de glutamato dependiente de NAD(P)H en heterocistos de Nostoc muscorum (55). No parece razonable atribuir la producción de glutamato en presencia de NADPH como agente reductor a una actividad NADPH-glutamato sintasa. Los trabajos de Neilson & Doudoroff (110) en los años setenta han demostrado la ausencia de esta actividad en varias especies de cianobacterias, entre las que se incluye Synechococcus 6301. Por otra parte, todas las glutamato sintasas dependientes de piridín nucleótidos descritas en organismos fotosintéticos son activas tanto con NADH como con NADPH (36, 45, 154), excepto la de Chlamydomonas reinhardtii y la de nódulos de altramuz, que son estrictamente dependientes de NADH (98, 19). En nuestro caso, no se observa ninguna formación de glutamato cuando el donador de electrones es NADH. Por lo tanto, pensamos que puede descartarse la existencia de esta actividad en Synechococcus 6301.

### III.B.1.3. Localización intracelular de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

La actividad glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se recupera en su totalidad en el sobrenadante de la centrifugación a alta velocidad de los extractos obtenidos tras la rotura de las células empleando métodos más o menos drásticos (tabla VI). La rotura por choque hipotónico de esferoplastos obtenidos por digestión de la pared celular con lisozima, considerado un método adecuado de obtención de membranas intactas (171), así como la descompresión en una prensa de French, otro método suave de rotura, tienen como consecuencia la liberación

TABLA VI

Localización intracelular de la glutamato sintasa  
de Synechococcus 6301

METODO DE ROTURA	% DE RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD TOTAL	
	SOBRENADANTE	SEDIMENTO
Prensa de French <sup>(1)</sup>	92	0
Lisozima y choque hipotónico <sup>(2)</sup>	105	0
Sonicación (4 min.) <sup>(3)</sup>	94	n.d.
Bühler <sup>(1)</sup>	100	n.d.

Extractos crudos obtenidos según se indica en los apartados II.B.1 y II.B.2.1-3 se centrifugan durante 15 minutos a 3.600 x g. El sobrenadante obtenido se centrifuga de nuevo a 33.000 x g (1), 41.000 x g (2) o 123.000 x g (3) entre 20 y 90 minutos, tras lo que se ensaya la actividad de sobrenadante y sedimento. n.d.: no determinado.



inmediata de actividad glutamato sintasa al medio. Con procedimientos mucho más enérgicos para la preparación de extractos, como son tratamiento con ultrasonidos y homogeneización por vibración (Bühler), se obtiene igualmente el total de la actividad en la fracción soluble.

Todo ello es indicativo de que la ferredoxina-glutamato sintasa se encuentra soluble o al menos no fuertemente asociada a membranas en la cianobacteria Synechococcus 6301.

#### III.B.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad glutamato sintasa

La tabla VII muestra los niveles de actividad glutamato sintasa ensayada in situ presentes en células de Synechococcus 6301 en fase exponencial de crecimiento cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. El nivel máximo (2,3 U/mg clorofila) se obtiene cuando las células crecen en amonio, siendo la actividad en nitrato de un 86% de este valor. Cuando se elimina la fuente de nitrógeno del medio, la actividad cae a un valor del 70% después de 6,5 horas.

Estos resultados parecen indicar que, a diferencia de otras enzimas que intervienen en la ruta de asimilación de nitrógeno inorgánico, la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 no está sometida a regulación significativa dependiente de la fuente de nitrógeno del medio. Esto resulta por otra parte lógico, ya que la glutamato sintasa lleva a cabo la segunda reacción en la ruta de asimilación de amonio, siendo la glutamina sintasa, enzima encargada de la primera reacción irreversible, quien soporta el peso de la regulación de esta importante vía asimilatoria.

#### III.B.1.5. Estudios cinéticos sobre la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 realizados in situ

Para establecer las condiciones óptimas de los ensayos

TABLA VII

Niveles de actividad glutamato sintasa en células de Synechococcus 6301 cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno

---

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD (U/mg clorofila)
NINGUNA	1,65
KNO <sub>3</sub>	2,01
NH <sub>4</sub> Cl	2,34

---

Células procedentes de un medio con nitrato potásico se lavan y resuspenden en medio fresco conteniendo la fuente de nitrógeno indicada, determinándose la actividad 6,5 horas más tarde, como se indica en el apartado II.C.1.1.

in situ, hemos estudiado distintos parámetros cinéticos de la enzima, determinados en células de Synechococcus 6301 permeabilizadas con tolueno.

#### III.B.1.5.1. Efecto de pH y temperatura de ensayo sobre la actividad glutamato sintasa determinada in situ

La figura 7 muestra la dependencia de la actividad glutamato sintasa determinada in situ respecto del pH al que se lleva a cabo el ensayo, en un intervalo comprendido entre 6,5 y 8. El pH óptimo resulta ser de 7,5, y coincide con el valor determinado posteriormente para la enzima purificada. El mismo valor de pH óptimo se obtiene empleando tampón HEPES-NaOH en el ensayo.

A pH 7,5 en tampón fosfato, la actividad ensayada a distintas temperaturas, en un intervalo comprendido entre 20 y 45°C, da un valor máximo a 40°C (fig. 8), coincidiendo con la temperatura óptima de crecimiento del organismo y manteniéndose el mismo nivel de actividad por encima de esta temperatura hasta 45°C al menos. Sin embargo, por razones de índole práctica y dado que el nivel de actividad obtenido a 30°C es considerable, se ha elegido esta temperatura de trabajo a lo largo de nuestro estudio.

#### III.B.1.5.2. Parámetros cinéticos de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 determinados in situ

Para determinar el tiempo óptimo de ensayo, se ha realizado una cinética de aparición de glutamato a 30°C y pH 7,5. En estas condiciones de ensayo, la actividad presenta una cinética perfectamente lineal durante los 15 primeros minutos (fig. 9), por lo que adoptamos este valor para los ensayos estándar. Se puede apreciar también que la aparición de glutamato no se desvía apenas de la linealidad durante al menos una hora.

Las figuras 10 a 12 muestran las representaciones de

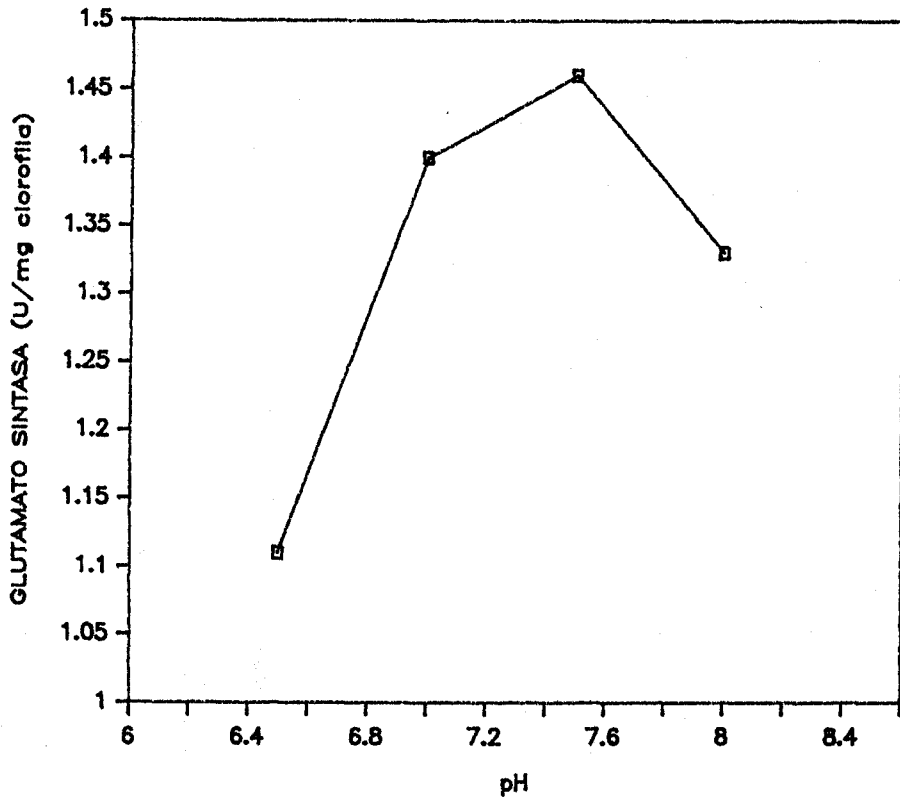


Figura 7: Efecto del pH sobre el ensayo in situ de la actividad glutamato sintasa

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.1.1, salvo que el pH del tampón fosfato varía como se indica. 25  $\mu$ g clorofila/ml ensayo.

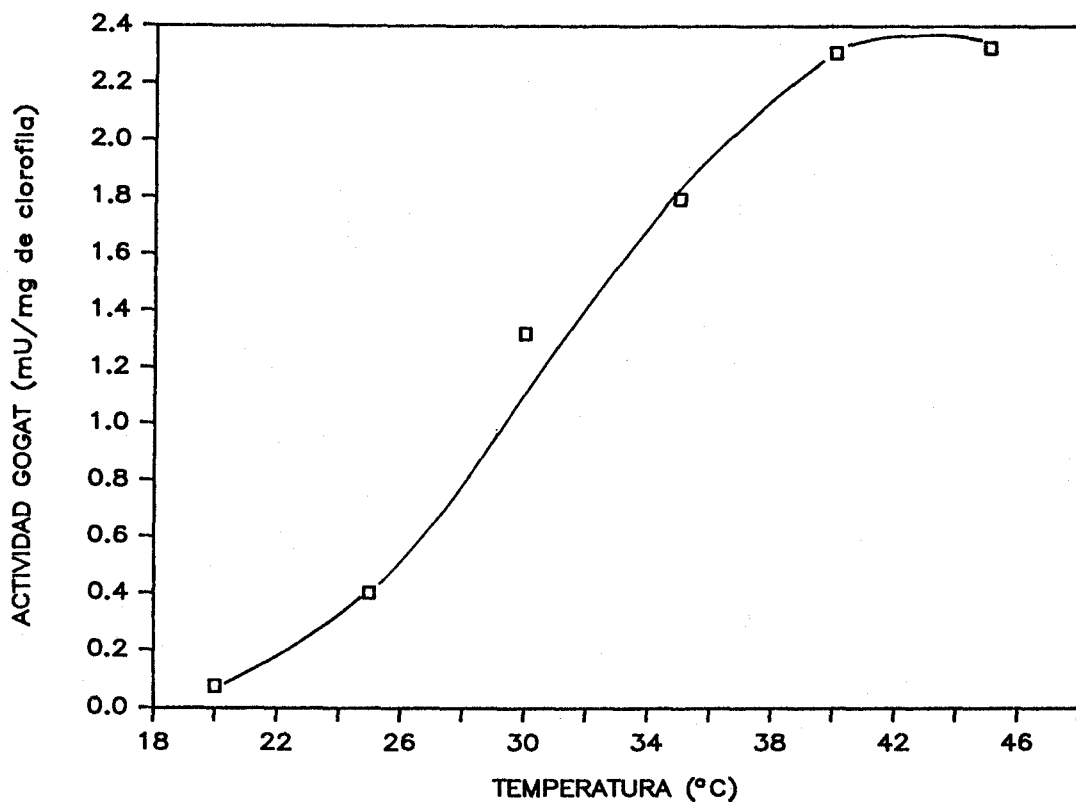


Figura 8: Efecto de la temperatura sobre el ensayo in situ de la actividad glutamato sintasa

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.1.1, sustituyendo el tampón fosfato por HEPES-NaOH 50 mM, pH 7, y variando la temperatura según se indica. 23,6  $\mu$ g de clorofila/ml de ensayo.

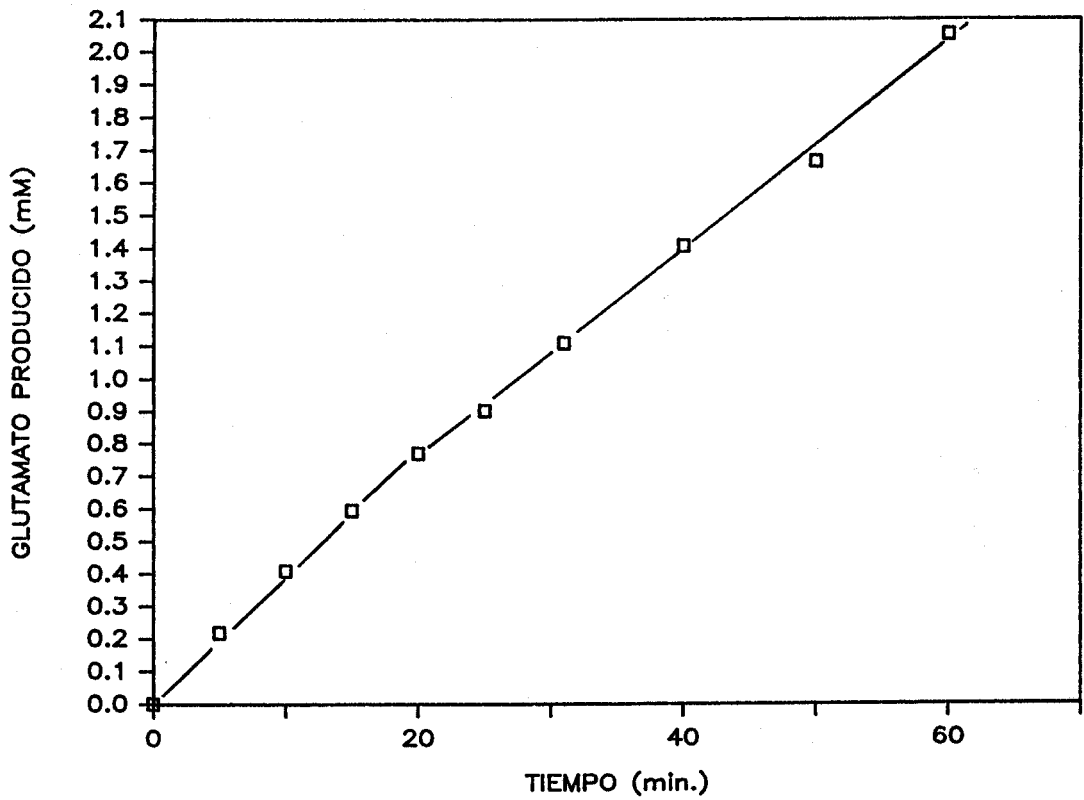


Figura 9: Cinética de la actividad glutamato sintasa determinada in situ

El ensayo se lleva a cabo como se indica en el apartado II.C.1.1, sustituyendo el tampón fosfato por HEPES-NaOH 50 mM, pH 7, y tomando fracciones alicuotas a los tiempos indicados. 14,4  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml de ensayo.

dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) de concentraciones variables de sustratos frente a velocidades determinadas in situ, para los distintos sustratos presentes en el ensayo ( $1/v$  vs  $1/[S]$ ).

El valor de  $K_m$  de la glutamato sintasa para la glutamina obtenido de este modo varía según sea la concentración del sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato en el ensayo, siendo aproximadamente 5 mM a 1mM de  $\alpha$ -cetoglutarato, y aproximadamente el doble a 5mM. La concentración de glutamina en el ensayo se mantiene sin embargo a 5 mM, ya que por encima de este valor, la glutamina contenida en las muestras a analizar (manteniendo la dilución máxima que permita detectar el glutamato formado) supera la zona lineal de respuesta del método de análisis; esto impide una correcta cuantificación de este aminoácido y no permite realizar las correcciones que se indica en el apartado III.A.1.

Concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato superiores a 5 mM dan lugar, en los ensayos in situ, a una inhibición por exceso de sustrato (fig. 12), por lo que con estos datos sólo es posible determinar la  $K_m$  aparente, obteniéndose un valor de 1,3 mM aplicando el método de Cleland (28).

Es interesante destacar la gran afinidad que la enzima parece presentar por el metilviológeno en sistemas de células permeabilizadas ( $K_m = 13 \mu M$ ). Como se ha discutido anteriormente (apartado III.B.1.2), la eficacia de este compuesto para actuar como donador de electrones de la glutamato sintasa es sólo aparente, y responde a la presencia en las células del transportador fisiológico ferredoxina.

### III.B.2. Purificación de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301

#### III.B.2.1. Método de purificación

El método que describimos a continuación para la purificación de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 está

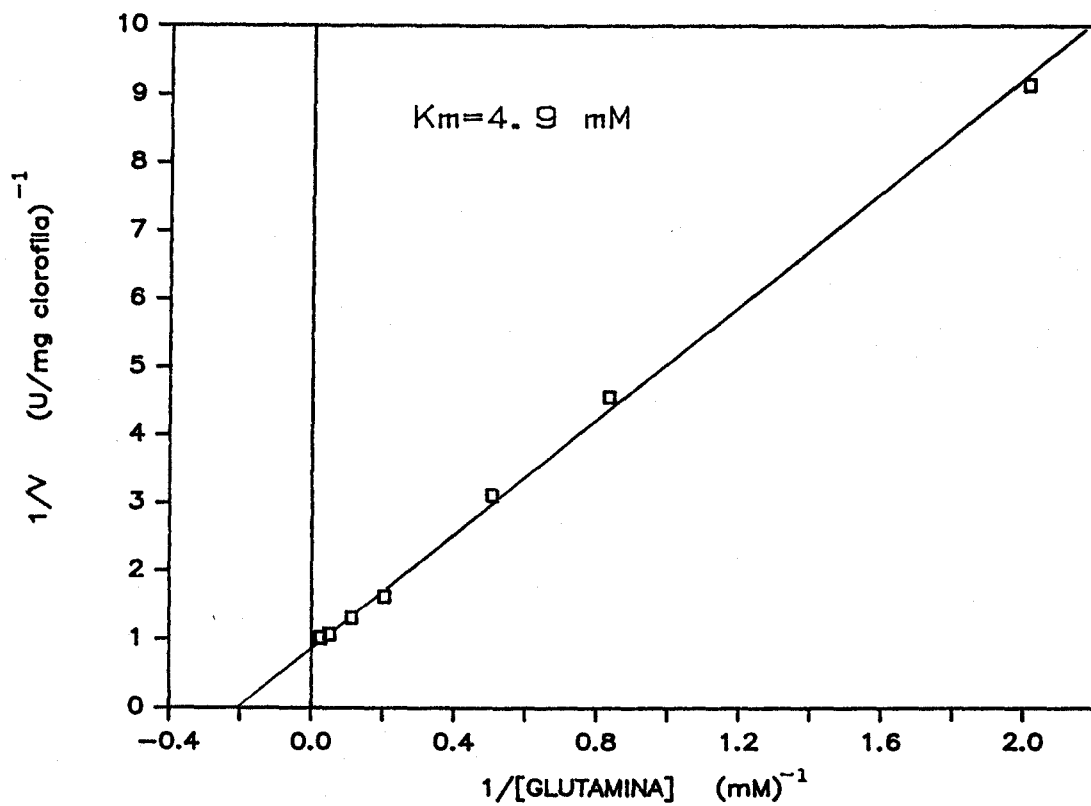


Figura 10:  $K_m$  de la glutamato sintasa para la glutamina determinada en células toluenizadas

Las condiciones son las descritas en el apartado II.C.1.1, excepto que las concentraciones de glutamina son las que se indican. 20  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml de ensayo.



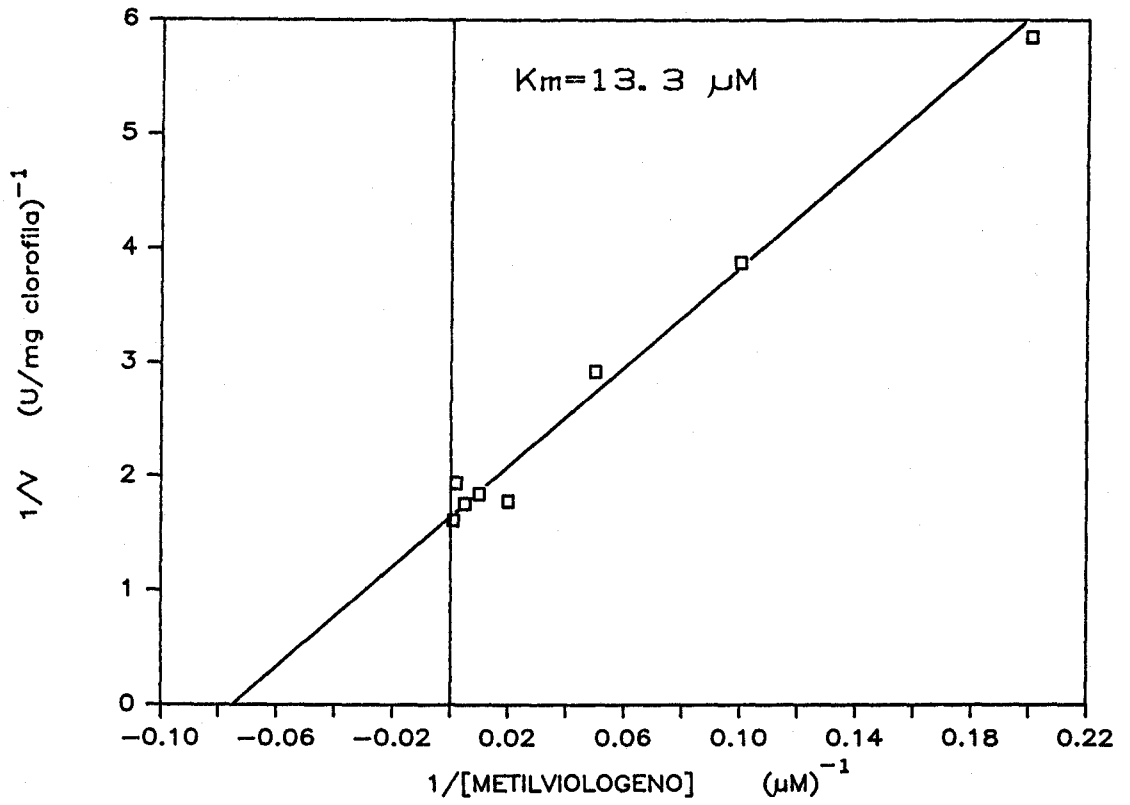


Figura 11:  $K_m$  de la glutamato sintasa para el metilviológeno determinada en células toluenizadas

Las condiciones son las descritas en el apartado II.C.1.1, excepto que las concentraciones de metilviológeno son las que se indican. 25  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml de ensayo.

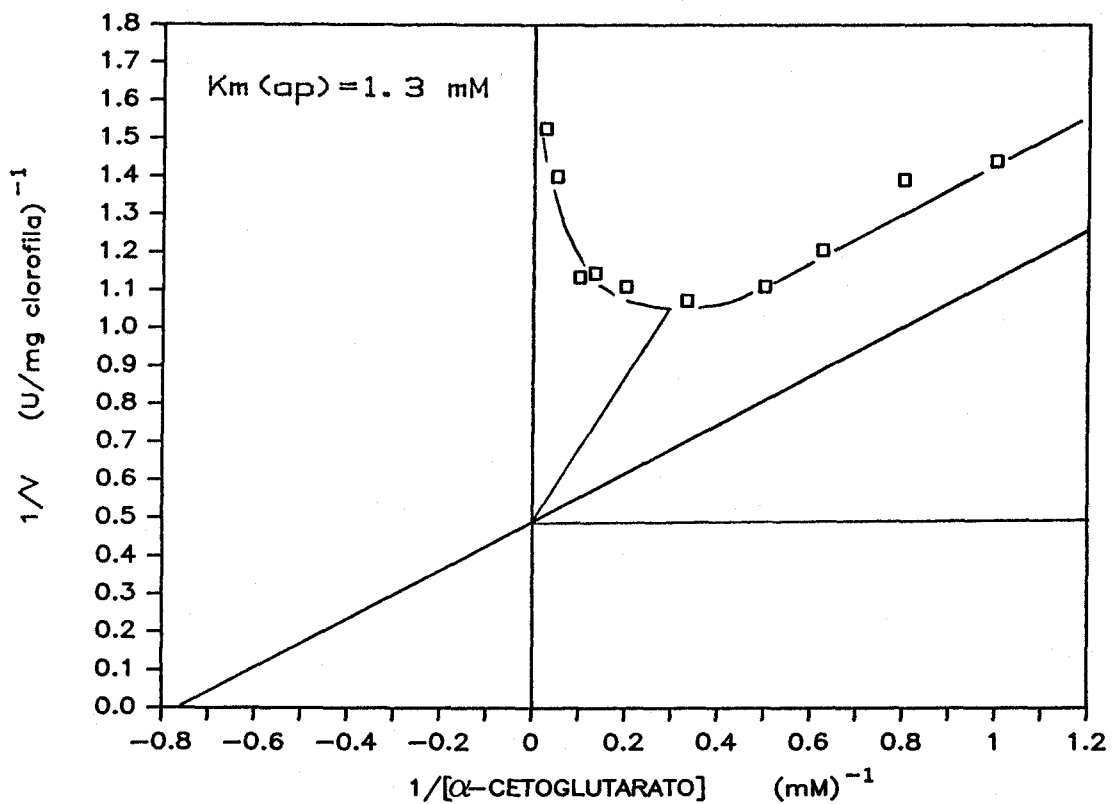


Figura 12:  $K_m$  de la glutamato sintasa para el  $\alpha$ -cetoqlutarato determinada en células toluenizadas

La condiciones son las descritas en el apartado II.C.1.1, excepto que las concentraciones de metilviológeno son las que se indican. 25  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml de ensayo.

La  $K_m$  aparente se calcula aplicando el método gráfico de Cleland (28).

basado en la utilización de dos pasos determinantes en el proceso: precipitación fraccionada con etanol y cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa, esta última descrita ya como método útil para la purificación de otras enzimas dependientes de ferredoxina (26, 95, 170).

Debido a la marcada inestabilidad de la enzima en solución, el tampón en que se lleva a cabo todo el proceso debe incluir varios agentes protectores. El tampón A, utilizado a lo largo de la purificación, es fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, suplementado con el quelante de metales EDTA (1 mM) y el agente protector de grupos sulfhidrilos  $\beta$ -mercaptoetanol (10 mM). Además se incluyen los sustratos  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina (1 mM de cada uno), cuya acción estabilizante se recoge en la tabla VIII. Se puede observar que la adición de cualquiera de los sustratos al tampón parece proteger a la enzima de la inactivación, aunque el  $\alpha$ -cetoglutarato resulta más efectivo que la glutamina. El glicerol, utilizado para reducir la actividad del agua e imitar las condiciones del entorno natural de la proteína (141), no tiene efecto positivo. En la obtención de los extractos crudos, puntos de partida de la purificación, el tampón A se suplementa inmediatamente antes de la rotura con 1 mM del inhibidor de proteasas de serina PMSF (51), y la concentración del tampón fosfato es de 50 mM. La adición de FAD al tampón, así como la rotura en condiciones microaeróbicas, no consiguen mejorar la estabilidad de la enzima.

El método empleado para la obtención de extractos crudos es el tratamiento con ultrasonidos (apartado II.B.1), tras el cual la actividad recuperada (ensayada con ferredoxina) es en promedio el 80% de la determinada in situ con metilviológeno antes de la rotura. Otros métodos ensayados para la obtención de extractos (prensa de French, choque osmótico u homogeneizador Bühler) dan como resultado una recuperación inferior de actividad.

Todo el proceso se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 0 y 4°C.

TABLA VIII

Efecto de la presencia de sustratos o glicerol sobre la recuperación de actividad tras el tratamiento con ultrasonidos

ACTIVIDAD DEL EXTRACTO		
ADICION	mU/mg prot.	%
ninguna	9,2	100
$\alpha$ -CGA 2 mM	12,4	135
GLN 2 mM	10,3	112
glicerol 10%	6,7	73

Células cultivadas con cloruro amónico en lugar de nitrato se recogen por centrifugación, se resuspenden en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 hasta una concentración de 1,69 mg proteína/ml y se dividen en 4 fracciones que se suplementan con los compuestos indicados. Seguidamente se someten a tratamiento con ultrasonidos durante 1,5 minutos y se ensaya directamente la actividad de la suspensión obtenida.

### III.B.2.1.1. Precipitación fraccionada con etanol del 40 al 70%

El primer paso en la purificación de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 es un fraccionamiento con etanol del extracto crudo obtenido por tratamiento con ultrasonidos, según se indica en el apartado II.B.1. Datos de purificaciones de otras proteínas de este organismo (26) así como nuestros propios resultados preliminares habían puesto de manifiesto anteriormente que la acción del etanol requería la presencia de alta fuerza iónica en el medio como condición imprescindible para descartar una fracción importante de las proteínas del extracto en el fraccionamiento. A partir de estas observaciones, se optimizó el proceso según se describe a continuación.

A un extracto crudo libre de células (apartado II.B.1) se le añade lentamente y con agitación suave, NaCl sólido pulverizado con mortero, hasta una concentración final de 0,8 M. Una vez disuelto el NaCl, al extracto se le añaden del mismo modo 0,66 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se incubaba en hielo durante 10 minutos con agitación ocasional. A continuación se centrifuga a  $8.000 \times g$  durante 15 minutos, obteniéndose un sobrenadante azul y un precipitado de color verde que se descarta.

Al sobrenadante se le añade un volumen igual de etanol en las mismas condiciones, para alcanzar un 70% (v/v). Tras 10 minutos de incubación, se centrifuga a  $8.000 \times g$  durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante, de color gris-azulado. El sedimento, también de color azul, se resuspende cuidadosamente con 12 a 15 ml de tampón A y se dializa frente a 2 l de este mismo tampón durante 4 h, con un cambio a las dos horas. Seguidamente, el dializado se centrifuga a  $35.000 \times g$  durante 15 minutos para descartar las proteínas desnaturalizadas.

La tabla IX muestra la recuperación media de este paso, cercana o superior al 100%, probablemente por eliminación de interferencias, con una purificación de 44 veces y una concentración considerable de la enzima, punto este importante para la estabilidad de la proteína.

TABLA IX

Recuperación y grado de purificación medios tras las distintas etapas de la purificación de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

ETAPA	RENDIMIENTO (%)	PURIFICACION (veces)
Fraccionamiento con etanol	111,5	44
Cromatografía de intercambio iónico	65	3,25
1 <sup>a</sup> afinidad en Fd-sefarosa	75,5	22
2 <sup>a</sup> afinidad en Fd-sefarosa	67	1,5

Los datos son la media de 4 purificaciones.

Si se mantienen las condiciones descritas para el fraccionamiento, el método resulta altamente repetitivo. Sin embargo, si se altera el contenido en proteína del extracto antes del tratamiento, ya sea por mayor concentración celular de partida o por mayor eficacia en el procedimiento de rotura, los resultados de rendimiento y grado de purificación varían notablemente, perdiéndose un gran porcentaje de la actividad en este primer paso. En nuestras condiciones, la concentración óptima de proteína para una buena recuperación en el fraccionamiento oscila entre 50 y 60 mg/ml.

Cuando el NaCl se sustituye por 1 M de  $\text{NaNO}_3$ , se obtiene un mismo grado de fraccionamiento de la proteína total; sin embargo, la recuperación de la actividad resulta generalmente inferior a la obtenida con NaCl, presentando bastante variabilidad de un experimento a otro. Cuando se omite la presencia de sal durante el fraccionamiento, el comportamiento de la proteína es muy diferente, recuperándose la actividad glutamato sintasa en el sobrenadante del 70% de etanol, con rendimiento y grado de purificación sensiblemente inferiores.

Igualmente, se han probado otros intervalos de concentración de etanol, obteniéndose en todos los casos peores resultados.

#### III.B.2.1.2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

Se emplea como paso previo a la cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefariosa, con el fin de obtener preparaciones más limpias para aplicar en ese proceso, y eliminar ferredoxina, que podría competir con la unida a la matriz de afinidad.

Se utiliza un lecho de DEAE-celulosa DE-52 (3x10 cm) formado a partir de unos 25 g (peso seco) de adsorbente equilibrados con tampón A y empaquetados en una columna de vidrio a un flujo de 170 ml/h.

La muestra resultante del fraccionamiento con etanol (22 a 27 ml) se aplica sobre el lecho a un flujo de 96 ml/h,

tras lo cual se lava la columna con 2,5 volúmenes de lecho de tampón A suplementado con 0,15 M de NaCl. Aproximadamente un 2% de la actividad glutamato sintasa se eluye con este lavado, junto con ficocianinas y otras proteínas (aproximadamente 60% de la proteína total). El material protéico retenido se eluye a continuación con un gradiente lineal de NaCl en tampón A (0,15 a 0,35 M y 300 ml de volumen total) a un flujo de 52 ml/h. La actividad glutamato sintasa se eluye como un solo pico a una concentración de NaCl de 0,24-0,27 M (fig. 13) formando parte de una banda de color verdoso. Las fracciones con suficiente actividad (entre 65 y 70% de la actividad aplicada, con una purificación de 3-4 veces, tabla IX) se reúnen y dializan durante una noche frente a 4 l de tampón A, pudiéndose perder en este proceso un 10% como máximo de la actividad.

La ferredoxina queda retenida en la parte superior de la columna, empezando a desplazarse lentamente al llegar el gradiente al valor de 0,35 M de NaCl. Esta proteína se recupera, de forma concentrada para su posterior aprovechamiento aplicando 0,5 M de NaCl en el tampón. Sin embargo, hemos observado que probablemente debido a las características del tampón (incluye una alta concentración de  $\beta$ -mercaptoetanol) si no se dializa inmediatamente después de eluída, la ferredoxina recuperada en este paso pierde su característico color rojizo al cabo de pocos días, de modo aparentemente irreversible. No se ha comprobado la capacidad de esta proteína decolorada para seguir actuando como transportadora de electrones.

Los valores de rendimiento de la purificación referidos hasta ahora corresponden a un proceso en el cual la actividad glutamato sintasa presente en las distintas etapas se ha determinado según el método descrito en el apartado II.C.1.2, utilizando ferredoxina reducida con ditionito como donador de electrones en el ensayo. Sin embargo, y como se indicó en el apartado III.B.1.2, cuando la actividad presente a lo largo del proceso se ensaya con metilviológeno como donador de electrones, se observa una pérdida drástica de actividad (aproximadamente 80%) después de la cromatografía de intercambio iónico. Esto es debido a que los niveles de actividad metilviológeno-glutamato



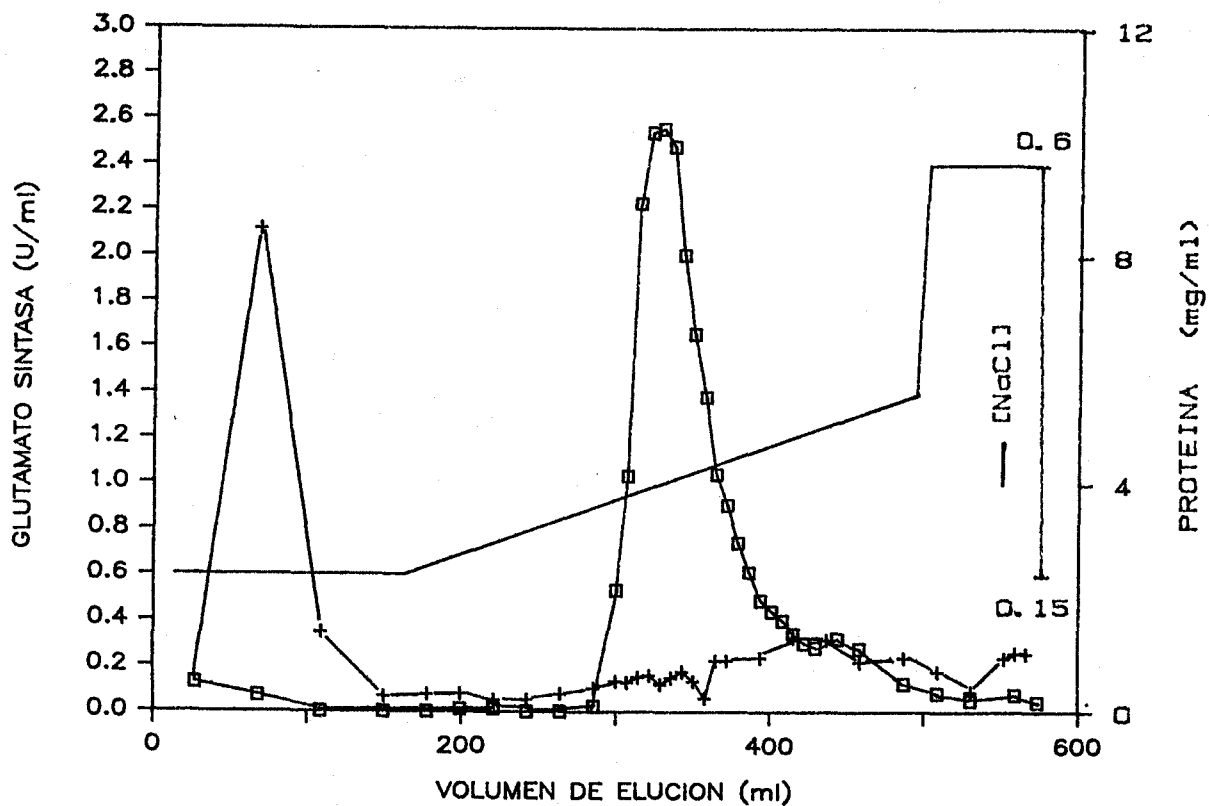


Figura 13: Perfil de elución de la actividad glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 de una columna de DEAE-celulosa

Las condiciones de la cromatografía se indican en el texto (apartado III.B.2.1.2.). Se aplica una muestra de 22,5 ml resultante del fraccionamiento con etanol, conteniendo 136 U.

(□) actividad glutamato sintasa; (+) proteína.

sintasa medidos en los pasos anteriores a la cromatografía de intercambio iónico son en realidad actividad ferredoxina-glutamato sintasa, ya que este eficiente donador de electrones está presente en todos los casos a alta concentración. Solamente al separar ferredoxina y glutamato sintasa en fracciones distintas tras la cromatografía, el ensayo refleja una auténtica actividad metilviológeno-glutamato sintasa, con un rendimiento del 20% con respecto al determinado antes de la cromatografía. Este valor coincide perfectamente con la relación de actividades obtenidas con metilviológeno y ferredoxina, respectivamente, en preparaciones purificadas de glutamato sintasa. (ver apartado III.B.3.2.1).

#### III.B.2.1.3. Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-sefarosa

Como ya discutíamos en el apartado III.B.2.1.2., el tampón A parece tener algún efecto negativo sobre la ferredoxina. Esto es especialmente evidente, y muy perjudicial, para los geles de ferredoxina-sefarosa. Efectivamente, para obtener un máximo rendimiento, el gel de afinidad ha de equilibrarse con tampón A. Se puede observar que, después de un uso prolongado (4 ó 5 cromatografías), y pese a lavar exhaustivamente la columna con tampón fosfato 20 mM pH 7,5 inmediatamente después de cada cromatografía, el gel de afinidad va perdiendo paulatinamente su color rojizo característico, a la vez que disminuye su capacidad de retener a la glutamato sintasa en nuestras condiciones. Este fenómeno de decoloración de la ferredoxina unida al gel, como consecuencia probable de la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el tampón de equilibrado, parece ser una constante en las cromatografías de afinidad en ferredoxina-sefarosa (Wallsgrave, comunicación personal). Por este motivo, los resultados obtenidos en este paso son siempre empíricos, dependiendo en las distintas purificaciones del estado de uso de cada columna, siendo necesaria a veces la repetición de la cromatografía para ultimar la purificación.

El gel de ferredoxina-sefarosa se prepara uniendo

ferredoxina purificada de *Synechococcus* 6301 (apartado II.B.3) a Sefarosa 4B por el procedimiento descrito en el apartado II.B.4. Este paso de cromatografía se lleva a cabo dos veces, empleando una columna de 0,8 x 4,5 cm, equilibrada con tampón A. En un primer paso la muestra, 50-60 ml del dializado obtenido del paso anterior, se aplica directamente sobre el lecho del gel a un flujo de 13 ml/h, lavándose posteriormente el lecho con unos 6 volúmenes de tampón A. En este lavado se puede eluir más del 95% de la proteína total de la muestra, dependiendo el grado de purificación en cada caso de la pureza de la fracción aplicada. Salvo en las primeras ocasiones en que se utilizó esta columna, un lavado más prolongado con tampón A provoca la elución lenta de la enzima, por lo que se aplica inmediatamente tampón A suplementado con 0,25 M NaCl para eluir toda la glutamato sintasa (fig. 14), con un rendimiento en el pico que oscila entre el 60 y el 75% de la actividad aplicada, y una purificación media de 22 veces (tabla IX). Las fracciones con buena actividad se dializan frente a 4 litros de tampón A durante una noche.

El dializado obtenido se aplica nuevamente sobre un gel de afinidad de las mismas características que el anterior, lavándose de nuevo la columna con varios volúmenes de tampón A, a fin de eliminar las impurezas no unidas específicamente al gel. Cuando de nuevo empieza a salir lentamente la actividad glutamato sintasa, se aplica 0,25 M de NaCl en tampón A. La actividad, aproximadamente un 70% de la aplicada, se eluye inmediatamente (fig. 15); el factor de purificación en este segundo paso es bajo (aproximadamente 1,5 veces), ya que la muestra aplicada tiene ya un alto grado de pureza.

En general, el rendimiento total del conjunto de las cromatografías de afinidad es de aproximadamente un 50%, siendo el grado de purificación global de unas 30 veces, repartidas entre las dos cromatografías.

La purificación de la nitrato reductasa de este mismo organismo emplea igualmente cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa (26), pero en este caso es necesario reducir previamente la ferredoxina con ditionito por ser baja la afinidad de la enzima por la ferredoxina oxidada. En nuestro

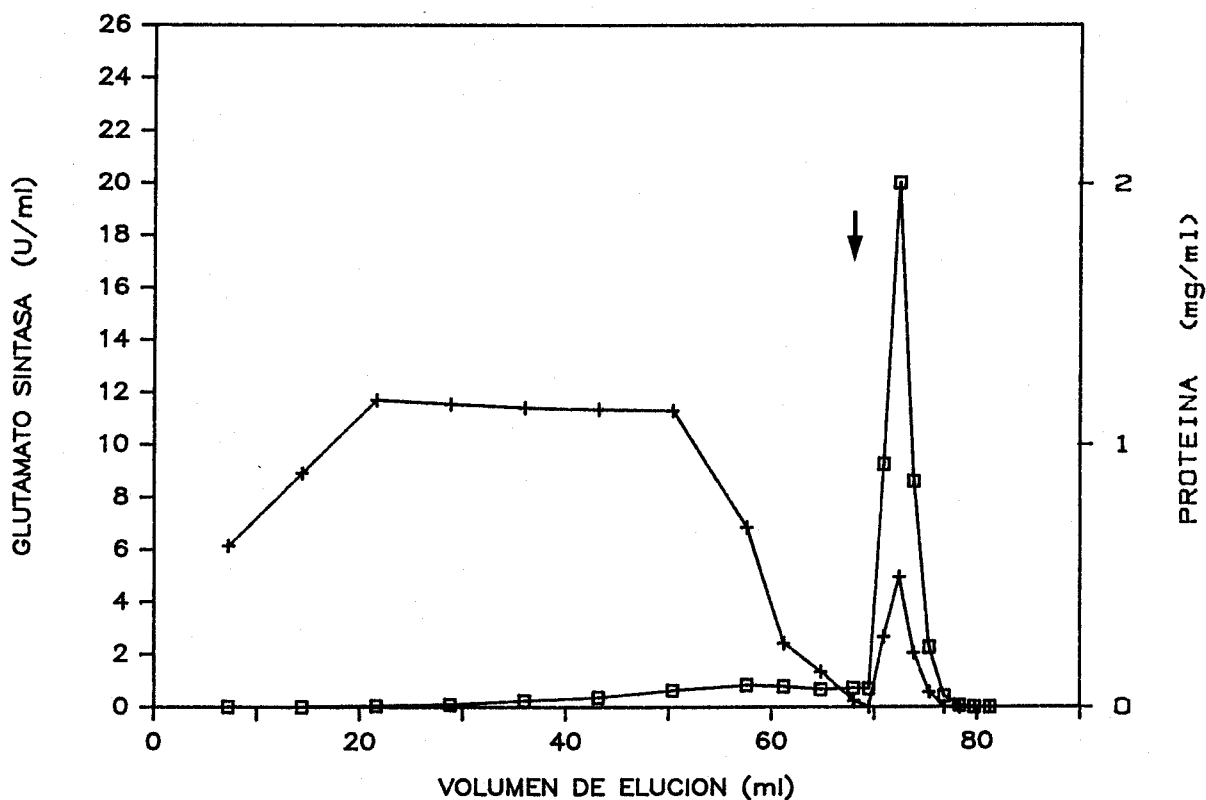


Figura 14: Perfil de elución de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 en la primera cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa

Las condiciones de la cromatografía se indican en el texto (apartado III.B.2.1.3.). Se aplican 56 ml de muestra conteniendo 88 U, procedentes de una cromatografía de intercambio iónico. La flecha indica la aplicación de 0,25 M de NaCl en tampón A.

(□) actividad glutamato sintasa; (+) proteína.

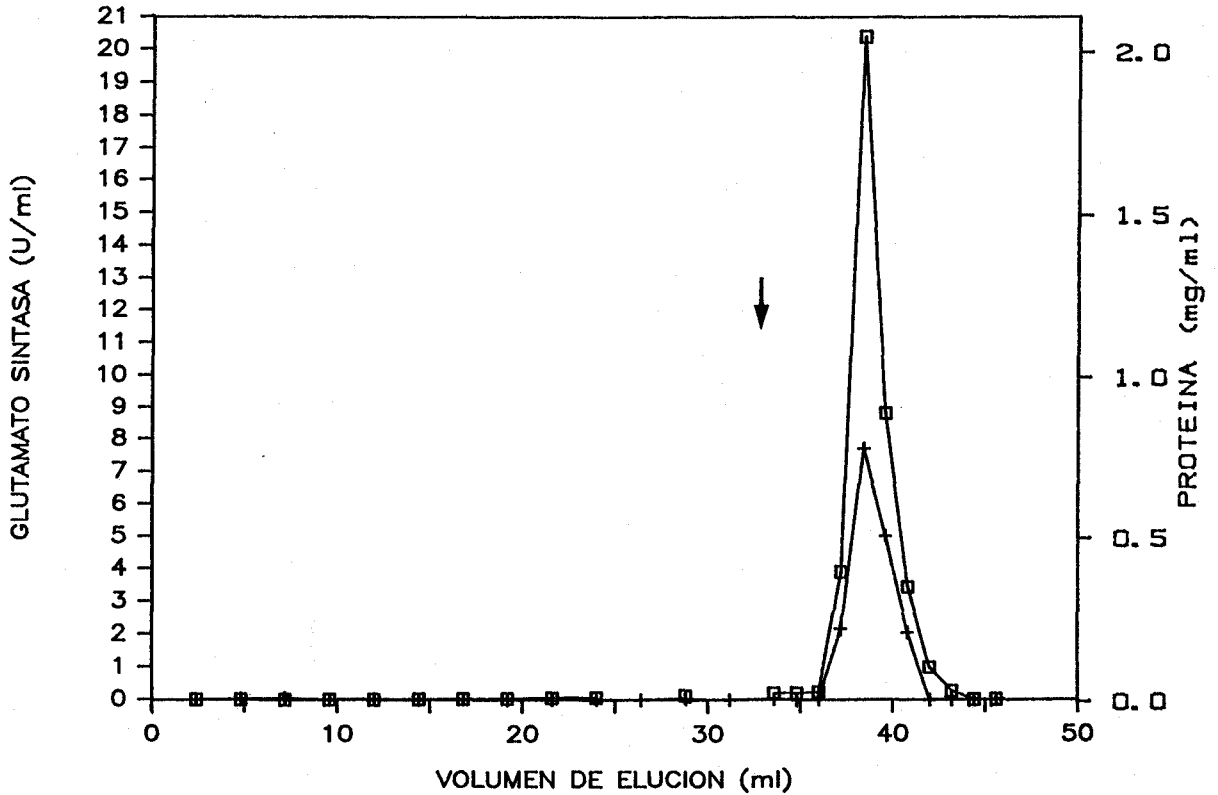


Figura 15: Perfil de elución de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 en la segunda cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa

Las condiciones de la cromatografía se indican en el texto (apartado III.B.2.1.3.). Se aplican 5,3 ml de muestra conteniendo 50,6 U, procedentes de una primera cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-sefarosa. La flecha indica la aplicación de 0,25 M de NaCl en tampón A.

(□) actividad glutamato sintasa; (+) proteína.

caso, cuando la muestra en tampón A reducido con ditionito se aplica sobre un lecho de ferredoxina-sefariosa cuya ferredoxina se ha reducido con el mismo tampón y se eluye con tampón A "oxidado" (sin ditionito) suplementado con 0,15 M NaCl, el rendimiento global es muy inferior al de las condiciones descritas anteriormente. La tabla X y las figuras 16a y b comparan los resultados de la cromatografía de afinidad con ferredoxina oxidada y reducida. Se observa que, al contrario de lo que ocurría con la nitrato reductasa, la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 presenta una afinidad similar por la ferredoxina oxidada o reducida, siendo su comportamiento cromatográfico semejante en ambos casos. Sin embargo, la presencia de ditionito y sus productos de oxidación parece producir una considerable inactivación de la enzima tras la cromatografía.

La tabla XI resume el proceso de purificación de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301, para el caso en que se obtuvo mejor rendimiento final. La recuperación fué del 43% de la actividad enzimática original, siendo la purificación total de unas 2.800 veces. La actividad específica de la preparación final obtenida es de aproximadamente 31 U/mg de proteína, ensayada con ferredoxina como donador de electrones.

La preparación de proteína así obtenida se encuentra muy diluída, y presenta un tenue color amarillo. Sin embargo, al someter dicha preparación a un proceso de concentración, ya sea por ultrafiltración a través de membrana o por diálisis, se produce una pérdida considerable de actividad (60%) de carácter irreversible, obteniéndose una preparación concentrada de color amarillo, pero con una actividad específica muy inferior a la de la enzima diluída (aproximadamente 12 U/mg de proteína).

### III.B.2.2. Criterios de homogeneidad

#### III.B.2.2.1. Constancia de la actividad específica

La coincidencia en forma y localización de actividad

TABLA X

Recuperación de actividad glutamato sintasa tras la cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa en distintas condiciones

METODO	RENDIMIENTO (%)	PURIFICACION
ESTANDAR <sup>(1)</sup> (todo oxidado)	81	39,2
COLUMNA "OXIDADA" <sup>(2)</sup> , MUESTRA "REDUCIDA"	27	6,5
TODO REDUCIDO <sup>(3)</sup>	37	17

(1) La cromatografía se lleva a cabo como se indica en el apartado II.E.3.2. y en el texto. Se aplican 2,6 U de glutamato sintasa en un extracto procedente de una cromatografía de intercambio iónico

(2) Mismas condiciones que (1), salvo que el tampón de equilibrado de la columna carece de glutamina y el tampón de la muestra se suplementa con 1 mg/ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Se aplican 633 mU de glutamato sintasa.

(3) Mismas condiciones que en (1), salvo que el tampón de equilibrado de la columna carece de glutamina y está suplementado, al igual que la muestra, con 1 mg/ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Se aplican 332 mU de glutamato sintasa.

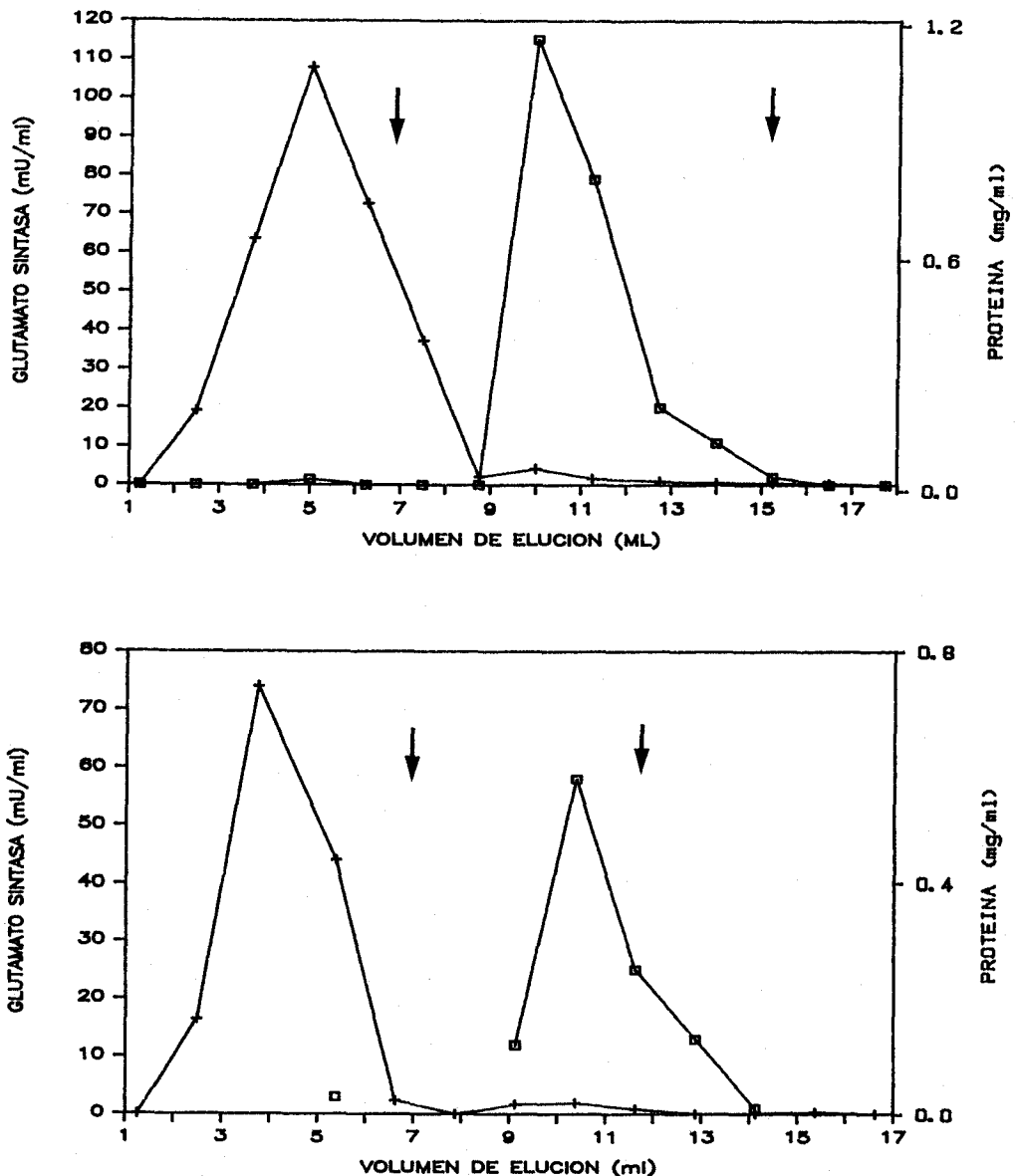


Figura 16: Perfil de elución de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 en gel de ferredoxina-sefarosa oxidado o reducido

a) 2 ml de muestra procedente de una cromatografía de intercambio iónico conteniendo 336 mU se aplican a un gel de ferredoxina-sefarosa (0,8 x 4,5 cm), lavándose primero con tampón A y posteriormente con el mismo tampón suplementado primero con 0,15 M de NaCl y después con 0,3 M (flechas).

b) 2 ml de muestra procedente de una cromatografía de intercambio iónico conteniendo 332 mU en tampón A suplementado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  1 mg/ml se aplican a un gel de ferredoxina-sefarosa previamente equilibrado en tampón A suplementado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  1 mg/ml. Seguidamente se lava con el mismo tampón y posteriormente con tampón A sin ditionito (tampón oxidado) suplementado primero con 0,15 M NaCl y después con 0,3 M (flechas).

(□) actividad glutamato sintasa; (+) proteína.



TABLA XI

Resumen de la purificación de la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301

FRACCION	ACTIVIDAD (U)	PROTEINA (mg)	ACT. ESP. (U/mg)	RECUPER. (%)	PURIFIC. (veces)
Extracto crudo	129	11470	0,01	100	1
Etanol (40 a 70%)	136	353	0,38	105	34
Eluato de DEAE-celulosa	93	30	3,10	72	283
Eluato de 1ª Fd-Sefarosa	69	3,9	17,85	54	1620
Eluato de 2ª Fd-Sefarosa	55	1,8	30,91	43	2800

enzimática y cantidad de proteína presentes en las fracciones resultantes de la segunda cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa (fig. 15) indica una estrecha correlación entre ambos parámetros y sugiere la presencia de una única proteína en estas fracciones, en las que la actividad específica presenta valores prácticamente constantes. En los casos en que se determinó la absorbancia a 438 nm (pico característico de las flavinas en esta proteína), los valores obtenidos en las distintas fracciones del pico se corresponde con la actividad o proteína, reforzando la idea de la presencia de una sola proteína en estas preparaciones.

Cuando las fracciones del pico de actividad eluido tras el último paso de cromatografía se someten a filtración en gel en HPLC (ver apartado II.E.3.3), se observa la aparición de un único pico de proteína, detectado por su absorbancia a 280 nm (fig. 17). Este pico eluye a los 34 minutos y se corresponde con la actividad glutamato sintasa, como demuestra la figura 39.

Sin embargo, este criterio ha de tomarse con precaución, ya que en algunos casos en que se observó igualmente un único pico en filtración en gel, una electroforesis posterior de las muestras reveló alguna tenue banda de proteína contaminante no detectada en el HPLC. El poder de resolución de esta última cromatografía no es pues muy elevado para proteínas de alto peso molecular; la figura 39 muestra cómo proteínas cuyos pesos moleculares difieren en 90 kDa se eluyen de la columna con sólo 4 minutos (aproximadamente 1,6 ml) de diferencia, valor cercano al de la anchura de los picos.

#### III.B.2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

##### III.B.2.2.2.1. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes

La pureza de la preparación enzimática final se comprueba mediante electroforesis analítica en gel de poliacrilamida, llevada a cabo según se indica en el apartado II.E.4.1. La preparación (fracción pico de una segunda cromatografía de

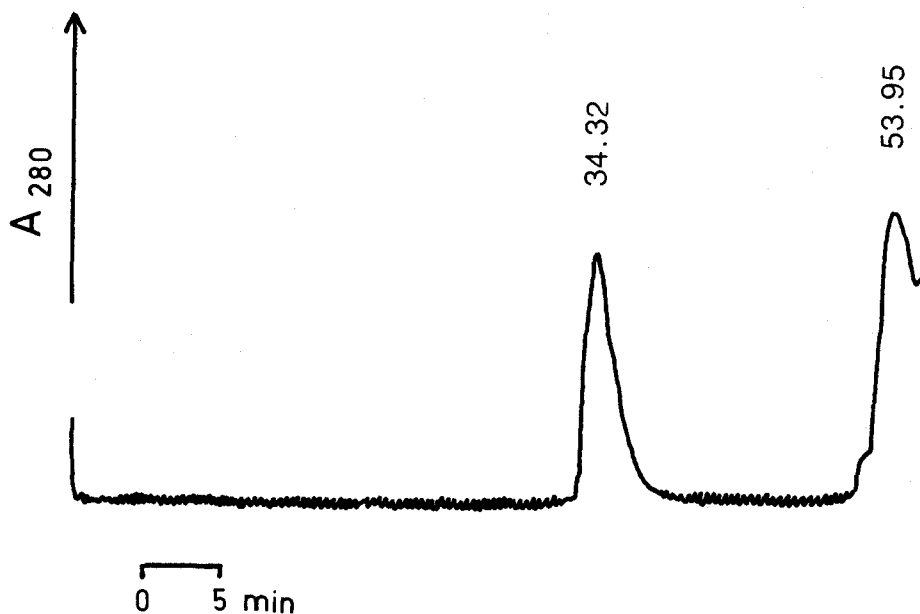


Figura 17: Cromatografía de filtración en gel mediante HPLC de la glutamato sintasa purificada de Synechococcus. Perfil de elución de proteína

15  $\mu$ l de muestra conteniendo 0,697 mg proteína/ml, procedentes de una cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa se someten a filtración en gel como se indica en el apartado II.E.3.3, detectándose la absorbancia a 280 nm.

El pico de 53.95 minutos corresponde a los componentes del tampón.

afinidad en ferredoxina-sefarosa) presenta dos bandas de proteína, que se corresponden en su localización con las dos bandas de decoloración que aparecen al teñir los geles para actividad glutamato sintasa (apartado II.E.4.4) (fig. 18). (Con esta tinción, las bandas de actividad no aparecen como una decoloración neta sino sólo como una diferencia en la tonalidad roja del gel revelado con trifeniltetrazolio). Del mismo modo, si se ensaya por separado la actividad glutamato sintasa de distintas fracciones cortadas a lo largo del gel, se obtiene un histograma cuyos picos coinciden con los del densitograma o las bandas de tinción. La actividad total recuperada de esta forma tras la electroforesis es muy baja (menos del 2%). La enzima parece ser pues inestable en la electroforesis, tal y como ocurre con la enzima de espinaca (65), en la que se observa además una pérdida considerable de flavina durante este proceso.

Las dos formas de estimación de actividad apoyan por tanto el que las dos bandas correspondan a proteína glutamato sintasa.

La intensidad de la banda minoritaria de proteína-actividad más alejada del frente varía de una purificación a otra, sugiriendo que esta banda sea el resultado de la degradación proteolítica de la enzima nativa.

#### III.B.2.2.2.2. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Cuando la electroforesis se lleva a cabo en presencia de SDS, se obtienen nuevamente dos bandas de proteína (fig. 19), cuyos tamaños varían en menos de 5 kDa. De nuevo la intensidad de la banda correspondiente al menor peso molecular varía de una purificación a otra, dato que apoya nuevamente el que una de ellas sea el producto de degradación de la proteína nativa. La posibilidad alternativa, existencia de dos isoenzimas con actividad ferredoxina-glutamato sintasa que copurificasen no es descartable con nuestros resultados. Sin embargo, y debido a la falta de constancia citada en la intensidad de la banda de menor peso molecular, nos parece una hipótesis poco probable. La

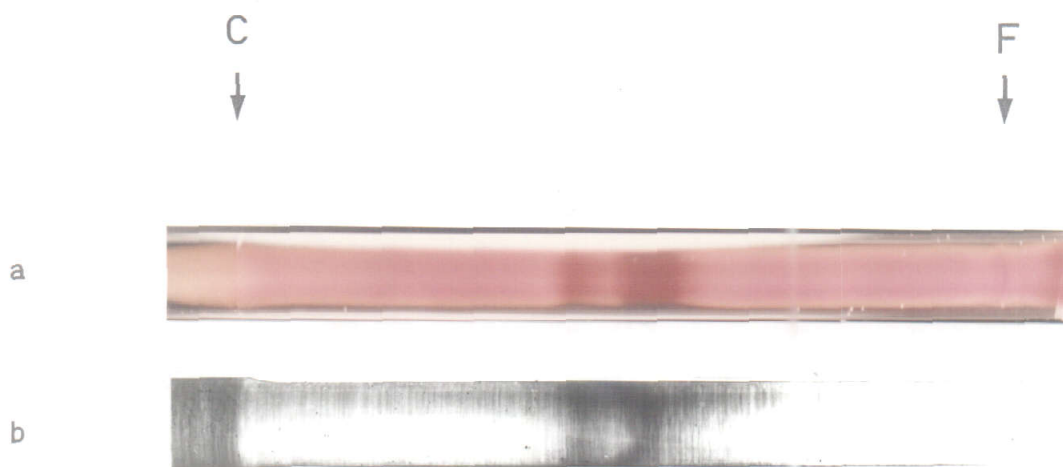


Figura 18: Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de la ferredoxina-glutamato sintasa purificada

Una muestra de 15  $\mu\text{g}$  de proteína se somete por duplicado a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6,25% de acrilamida. a) Tinción de actividad. b) Tinción de proteína. Los detalles del proceso se describen en el apartado II.E.4.1.

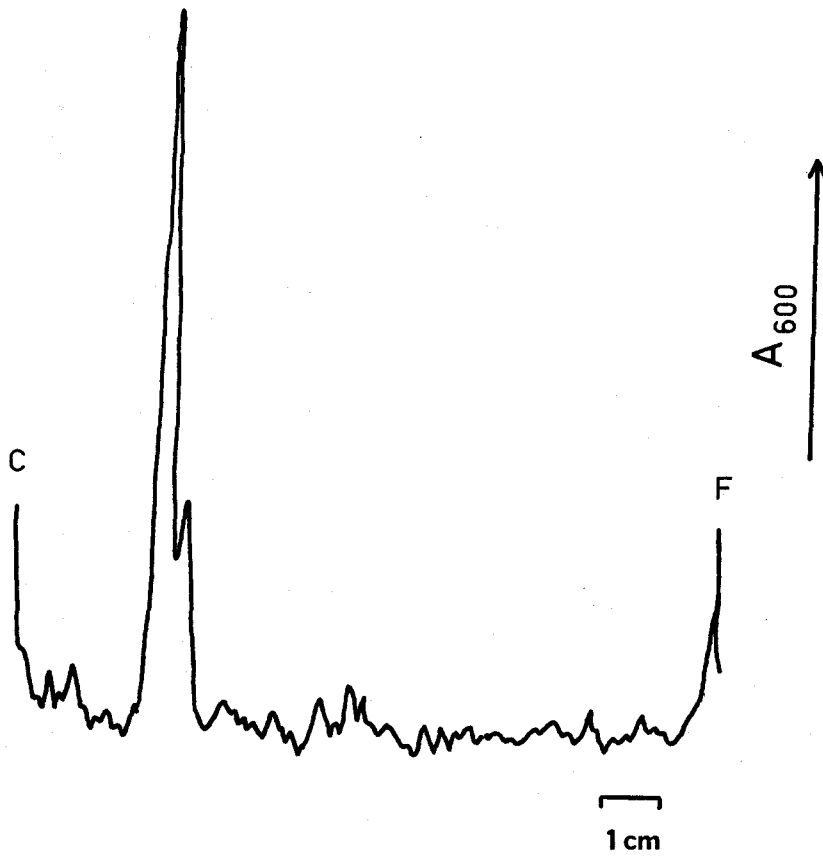


Figura 19: Densitograma correspondiente a la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la fracción pico eluida de la segunda ferredoxina-sefarosa

Tinción de proteína. Volumen de muestra 50  $\mu$ l. Acrilamida al 6%. Otras condiciones como se indica en el apartado II.E.4.2.

presencia de altos niveles de actividad proteolítica ha sido descrita en extractos de cianobacteria (142), inhibibles por PMSF sólo en un 60%, y responsables, entre otros, de la aparente heterogeneidad electroforética de la ferredoxina-NADP reductasa purificada de Anabaena sp 7119. Este podría ser el caso de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301.

Puede afirmarse, por tanto, que dentro de los valores de resolución del método (2-3%), la única proteína presente en las preparaciones es glutamato sintasa, aunque una porción de las moléculas esté parcialmente degradada.

### III.B.3. Propiedades de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

#### III.B.3.1. Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades que se exponen a continuación se resumen en la tabla XII.

##### III.B.3.1.1. Coefficiente de sedimentación

Muestras alícuotas de la preparación de glutamato sintasa purificada, conteniendo 0,2 U de actividad, se someten a centrifugación en gradiente lineal de sacarosa (5-20%) como se indica en el apartado II.E.2. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 20. Existe una relación lineal entre los valores de coeficiente de sedimentación de las proteínas patrón y su localización en el gradiente una vez finalizada la centrifugación (100). La glutamato sintasa se localiza por su actividad dependiente de ferredoxina en una posición correspondiente a un valor de 8,46 S.

##### III.B.3.1.2. Radio de Stokes

La determinación del radio de Stokes de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 se realiza siguiendo el método

## TABLA XII

Resumen de las propiedades fisicoquímicas de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

---

PARAMETRO	VALOR
RADIO DE STOKES	4,32 nm
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	8,46 S
$f/f_0$	1,213
PESO MOLECULAR (SDS)	160,4 kDa
PESO MOLECULAR (coef. sediment. y R. Stokes)	156,0 kDa
NUMERO DE SUBUNIDADES	1

---



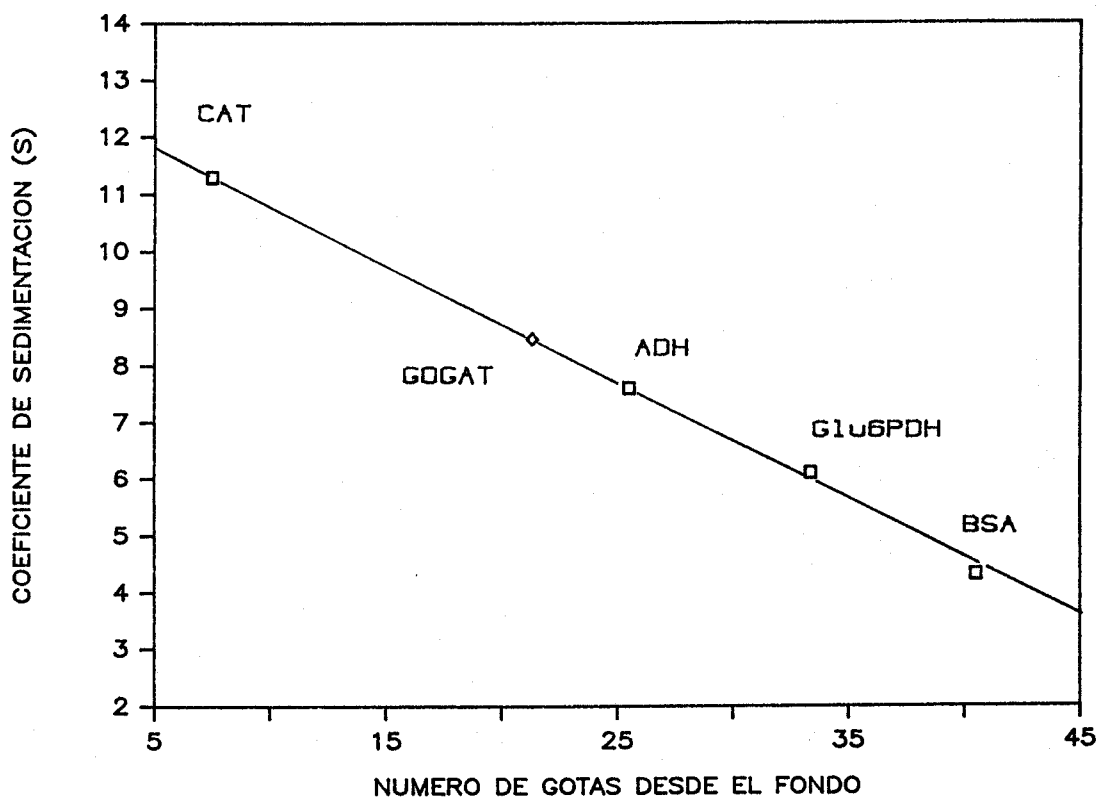


Figura 20: Determinación del coeficiente de sedimentación de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 por centrifugación en gradiente de sacarosa

Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.E.2.

descrito por Siegel y Monty (146) mediante cromatografía de filtración en gel en Sephacryl S-300 superfine según el procedimiento descrito en el apartado II.E.3.3. La figura 21 muestra los resultados obtenidos al someter sucesivamente a filtración proteínas marcadoras de radio de Stokes conocido y 0,5 U de glutamato sintasa. Existe una relación lineal entre los radios de Stokes de los marcadores y el  $[\log(K_{av})]^{1/2}$ , un parámetro que se define como la fracción de la matriz del gel que puede ser ocupada por una esfera de radio igual al radio de Stokes de la proteína:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde  $V_e$  es el volumen de elución de una proteína dada,  $V_o$  es el volumen vacío o de exclusión del lecho del gel (24,84 ml), determinado por filtración de azul dextrano, y  $V_t$  es el volumen total de la columna (64,4 ml). A partir de estos datos y del volumen de elución de la glutamato sintasa (38,12 ml), se calcula por interpolación un valor de 4,32 nm como correspondiente al radio de Stokes de la enzima.

Cuando la filtración se lleva a cabo mediante HPLC en geles de sílice en las columnas Protein Pak 125 y 300SW de Waters (EE.UU.), se obtiene un valor de radio de Stokes semejante: 4,35 nm.

Es interesante comentar que la recuperación de actividad tras la cromatografía de filtración en gel es muy pobre en el caso de filtración convencional (menor del 30%) y mediocre en HPLC (cerca del 60%). El fenómeno de inactivación como consecuencia de una filtración en gel ha sido también observado en la enzima procedente de maíz (102) y Vicia (167).

### III.B.3.1.3. Peso molecular determinado en condiciones no desnaturalizantes

Cuando los volúmenes de elución de las proteínas

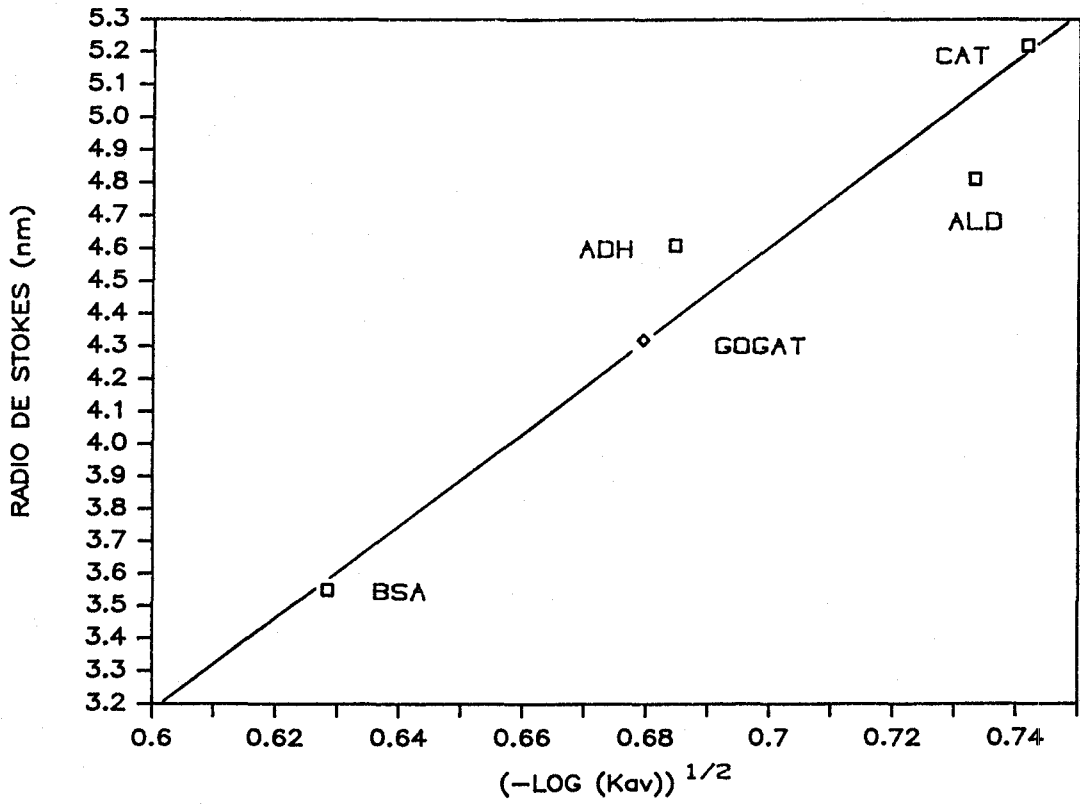


Figura 21: Determinación del radio de Stokes de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 por cromatografía de filtración en gel en Sephacryl S-300

Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.E.3.3.

obtenidos de la filtración en gel descrita en el apartado anterior se representan frente al logaritmo de su peso molecular, se obtiene una correspondencia lineal, de la que se puede deducir un valor aproximado de peso molecular para la glutamato sintasa de 138 kDa asumiendo forma esférica, tanto en cromatografía convencional como mediante HPLC.

El peso molecular de la glutamato sintasa se ha estimado con mayor exactitud siguiendo el método de Siegel y Monty (146), que combina los valores obtenidos de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación. La fórmula empleada ha sido:

$$P_m = \frac{6 \eta \pi N R_s^3 S}{(1 - \bar{v} \rho)}$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio (1,017 cp), N el número de Avogadro,  $R_s$  el radio de Stokes (4,32 nm), S el coeficiente de sedimentación (8,46 S),  $\bar{v}$  el volumen parcial específico, asumido como 0,725 cm<sup>3</sup>/g (96) y  $\rho$  la densidad del medio (1,007 g/cm<sup>3</sup>). El peso molecular calculado por este procedimiento, que puede considerarse de mayor precisión que el obtenido por filtración en gel únicamente, resulta ser de 156 kDa.

#### III.B.3.1.4. Peso molecular determinado en condiciones desnaturalizantes. Estimación del número de subunidades

Muestras alícuotas de 15-25  $\mu$ l de una preparación enzimática purificada, conteniendo 30-50  $\mu$ g de proteína, se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de acrilamida conteniendo 0,1% de SDS. La figura 19 muestra la presencia de dos bandas de proteína que migran a velocidades muy semejantes. Como se discutió en el apartado III.B.2.2.2.1, las dos bandas que aparecen corresponden a proteína glutamato sintasa.

Para determinar su peso molecular, se someten a electroforesis simultáneamente una serie de proteínas patrones

con cadenas polipeptídicas de peso molecular conocido. La figura 22 muestra el resultado obtenido al representar el logaritmo decimal de los pesos moleculares frente a los valores de  $R_f$  de las proteínas marcadoras. El peso molecular, calculado por interpolación a partir de la movilidad relativa de la banda mayoritaria correspondiente a la glutamato sintasa, resulta ser de 160 kDa. La segunda banda de proteína, minoritaria, que se observa en esta electroforesis presenta un peso molecular de 155 kDa, es decir, inferior en un 3% al obtenido para la banda mayoritaria. La intensidad de la banda de proteína de menor peso molecular varía de una purificación a otra, apoyando el que sea producto de la degradación proteolítica de la enzima, cuyo peso molecular original sería el determinado para la banda superior.

El valor de 160 kDa obtenido para la enzima desnaturada está próximo al calculado por el método de Siegel y Monty para la proteína nativa (156 kDa). Por lo tanto, pensamos que se puede afirmar que la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 es una proteína monomérica, constituida por una sola cadena polipeptídica de un peso molecular de 158 kDa.

El bajo valor obtenido en la filtración en gel es difícilmente explicable, aunque coincide con lo descrito para la glutamato sintasa de espinacas (65), donde igualmente la filtración en gel subestima el peso molecular de la enzima.

### III.B.3.1.5. Determinación de la fricción relativa

Un parámetro interesante y que da información acerca de la forma de las macromoléculas es la fricción relativa,  $f/f_0$ , donde:

$$f = 6 \pi \eta R_s \quad \text{y} \quad f_0 = 6 \pi \eta R_0 \quad ,$$

siendo  $R_0 = (3 P_m \bar{v} / 4 \pi N)^{1/3}$  ,

donde  $f_0$  y  $R_0$  son respectivamente los valores del coeficiente de fricción y del radio de una macromolécula esférica del mismo

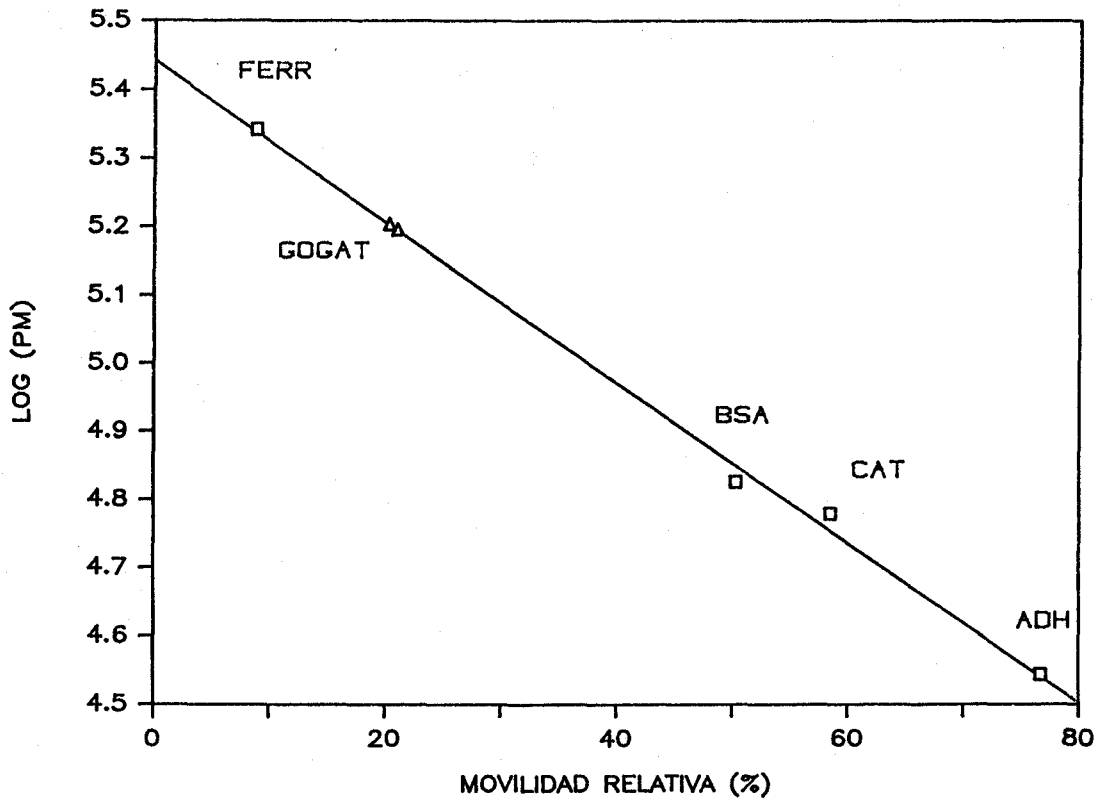


Figura 22: Determinación del peso molecular de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

La electroforesis se lleva a cabo en un gel al 7% de acrilamida según se detalla en el apartado II.E.4.2.

peso molecular y densidad que la estudiada.

La fricción relativa se define como:

$$f/f_0 = \frac{R_s}{(3 P_m \bar{v} / 4 \pi N)^{1/3}}$$

y nos da información sobre el grado de asimetría de las moléculas. Valores de fricción relativa entre 0,9 y 1,4 han sido descritos para proteínas globulares, mientras que moléculas muy asimétricas dan valores mayores (23).

El valor de fricción relativa obtenido para la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 ha sido de 1,213, sugiriendo una forma algo alargada para esta proteína globular en su estado nativo.

#### III.B.3.1.6. Espectros de absorción

Como se ha descrito en el apartado III.B.2.1.3, la preparación enzimática final presenta un marcado color amarillo, sugiriendo la presencia de un grupo prostético flavínico en la glutamato sintasa de Synechococcus 6301. La figura 23 muestra como, efectivamente, una preparación homogénea de la enzima presenta un espectro de absorción típico de flavoproteína, con máximos de absorción a 279, 370 y 438 nm, y hombros a 418 y 476 nm. Estos últimos son frecuentemente observados en flavoproteínas cuando se comparan con flavinas libres, y son atribuibles a interacciones hidrofóbicas con la apoproteína (109). La relación entre la absorbancia a 279 y 438 nm tiene un valor medio de 11.

La figura 24 muestra la variación que se produce en el espectro de absorción cuando la preparación homogénea de proteína se reduce con un exceso de ditionito. Puede apreciarse la desaparición de los picos característicos de la flavina oxidada, así como su recuperación total una vez que se añade el sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato a la preparación enzimática. Esto pone de manifiesto el papel catalítico del grupo flavínico en la reacción de la glutamato sintasa.

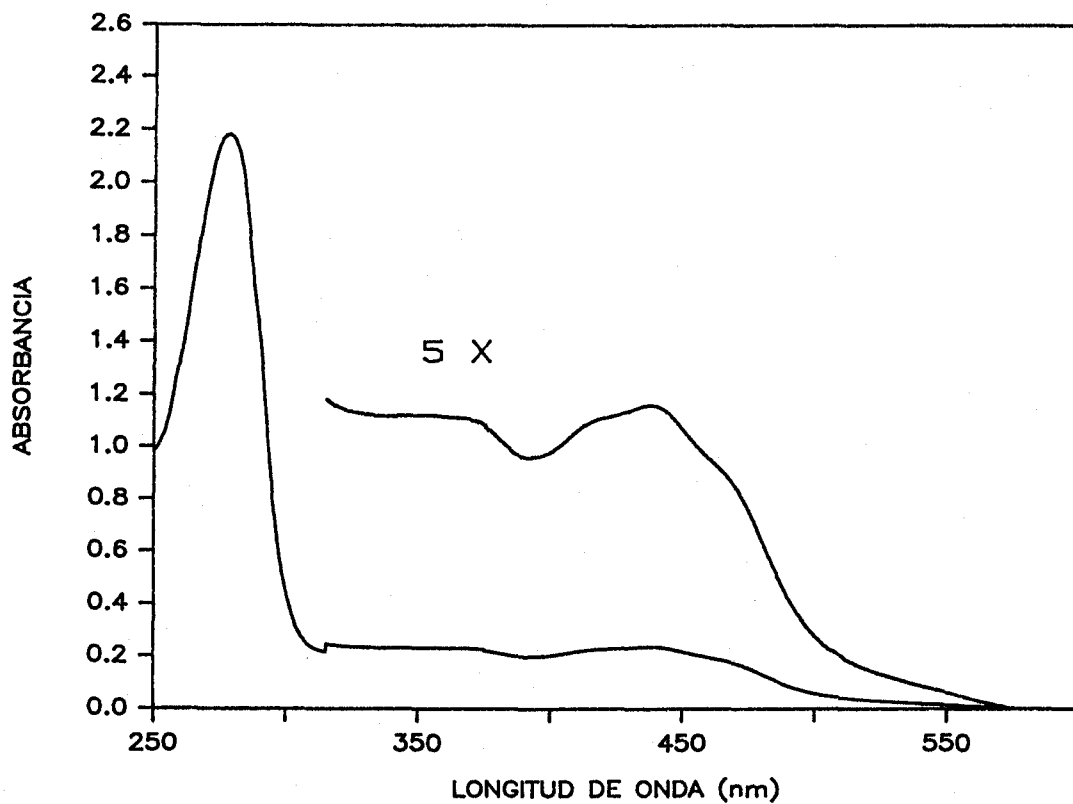


Figura 23: Espectro de absorción de la glutamato sintasa de *Synechococcus 6301*

Enzima purificada, 2,26 mg proteína/ml, en tampón A. Otras condiciones según se detalla en el apartado II.E.5.



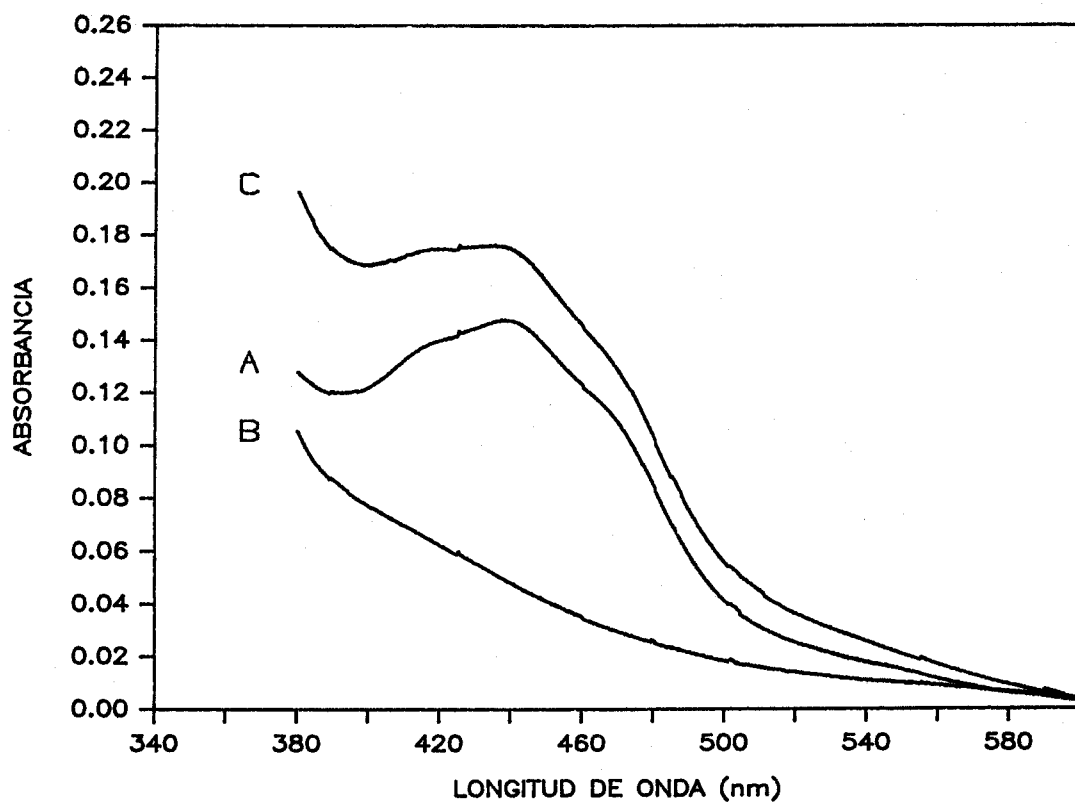


Figura 24: Espectro de absorción de la glutamato sintasa de *Synechococcus 6301* en sus formas oxidada y reducida con ditionito

[A] Enzima purificada, aproximadamente 1,6 mg proteína/ml, en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5. [B] A reducida por adición de ditionito en exceso. [C] B + unos cristales de  $\alpha$ -cetoglutarato.

### III.B.3.1.7. Identificación y cuantificación del grupo prostético flavínico

El grupo prostético flavínico de la glutamato sintasa se ha analizado por cromatografía de adsorción en fase reversa mediante HPLC y detección fluorimétrica, tras su separación de la apoenzima empleando distintos tratamientos y comparando con patrones de flavinas de concentración conocida tratados de forma semejante.

La tabla XIII muestra los tiempos de retención, tras la cromatografía, de los picos correspondientes a FMN, FAD y riboflavina detectados por su fluorescencia a 530 nm al ser excitados a 450 nm. Igualmente aparece el tiempo de retención del pico único que se obtiene al someter al mismo tipo de análisis el grupo prostético extraído de la proteína por los tres distintos métodos que se indican. Se puede deducir de estos datos que la glutamato sintasa contiene un solo tipo de grupo prostético flavínico: FMN.

La tabla XIV muestra la cantidad de FMN extraído de distintas muestras de glutamato sintasa purificada de concentración de proteína conocida tratadas siguiendo métodos diferentes. Se observa que con cualquiera de los métodos empleados para la extracción del grupo flavínico, el resultado es en todos los casos de una sola molécula de FMN presente por molécula de proteína.

De todos los métodos empleados para la extracción, con el que se obtienen los mejores cromatogramas es con ácido tricloracético (TCA), debido al pequeño volumen inyectado. El método que presenta mayor variabilidad es el de ebullición en medio ácido, ya que es necesario neutralizar las muestras tras la extracción, con el consiguiente aumento de volumen de muestra y de fuerza iónica de la misma, lo que produce una pérdida en la resolución de los picos correspondientes a las distintas flavinas.

TABLA XIII

Identificación del grupo prostético flavínico de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 mediante HPLC

Método de extracción:	TIEMPO DE RETENCION (min.)		
	100°C	ácido 100°C	TCA 4°C
MUESTRA			
FAD	6,37	11,6	6,08
FMN	10,3 <sup>(2)</sup>	15,2 <sup>(4)</sup>	8,37 <sup>(4)</sup>
Riboflavina	33,6	25,04	-
GOGAT 1 (1)	10,21 <sup>(3)</sup>	16,1 <sup>(2)</sup>	-
GOGAT 2 (1)	10,66	-	-
GOGAT 3 (1)	11,04	14,4	8,7

La cromatografía de las flavinas así como su separación (en su caso) de la apoenzima, se llevan a cabo como se indica en el apartado II.D.2.

(1) GOGAT 1, 2 y 3 son tres preparaciones distintas de glutamato sintasa purificada.

(2) valor medio de 3 análisis

(3) valor medio de 4 análisis

(4) valor medio de 2 análisis

TABLA XIV

Quantificación del FMN presente en la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

METODO DE EXTRACCION	GOGAT 1		GOGAT 2		GOGAT 3	
	(pmol)		(pmol)		(pmol)	
	prot.	FMN	prot.	FMN	prot.	FMN
100°C	80	81 <sup>(1)</sup>	72	81	137	125
ACIDO 100°C	80	86 <sup>(2)</sup>	-	-	137	173
TRICLORACETICO	-	-	-	-	137	146,5

La extracción de flavina y su posterior análisis se llevan a cabo como se indica en el apartado II.D.2.

(1) y (2) son la media de tres análisis.

GOGAT 1, 2 y 3 son tres preparaciones distintas de glutamato sintasa purificada.

### III.B.3.1.8. Composición de aminoácidos de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301

El resultado del análisis de los aminoácidos obtenidos por hidrólisis ácida de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 se muestra en la tabla XV. Es interesante resaltar la alta proporción de aminoácidos apolares (Ala, Leu, Val), así como de aminoácidos ácidos, lo que justifica el comportamiento de la proteína en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

La tabla XVI compara la composición de aminoácidos de las ferredoxina-glutamato sintasas purificadas a partir de cebada, tomate (9), del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (52) y de *Synechococcus* 6301. Se puede apreciar la coincidencia en la alta proporción de aminoácidos apolares y con carácter ácido entre las enzimas de distinta procedencia. La glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301 presenta una mayor similitud con la misma enzima procedente de tomate.

### III.B.3.2. Estudios catalíticos y cinéticos de la glutamato sintasa de *Synechococcus* 6301

#### III.B.3.2.1. Donadores de electrones

La tabla XVII compara los valores de actividad glutamato sintasa (aparición de glutamato dependiente de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato) obtenidos con una preparación purificada de ferredoxina-glutamato sintasa empleando distintos donadores de electrones. De entre los agentes reductores fisiológicos ensayados, resulta evidente que la enzima sólo utiliza ferredoxina reducida, químicamente con ditionito o a través del sistema acoplado ferredoxina-NADPH oxidorreductasa/NADPH, como donador de electrones para llevar a cabo la reacción, siendo la actividad nula con flavín o piridín nucleótidos. Por otra parte, y contrariamente a lo que ocurre en otras glutamato sintasas y en general con enzimas dependientes de ferredoxina, el donador

TABLA XV

Composición de aminoácidos de la glutamato sintasa  
de Synechococcus 6301

AMINOACIDO	PROPORCION <sup>(1)</sup>	NUMERO DE RESIDUOS <sup>(2)</sup>
Asx	7,05	140
Glx	9,05	180
Ser	4,75	94,5
His	2,15	43
Gly	5,2	103
Arg	4,2	83,5
Thr	3,4	67,5
Ala	8,1	161
Tyr	1,75	35
Met	1,0	20
Val	4,95	98,5
Phe	2,5	50
Ile	3,35	66,5
Leu	8,05	160
Lys	1,55	31

La hidrólisis de la proteína y el posterior análisis se llevan a cabo como se indica en el apartado II.D.3.

(1) En relación a la metionina.

(2) Por monómero, sin considerar Cys, Pro ni Trp.

TABLA XVI

Comparación de la composición de aminoácidos de ferredoxina-glutamato sintetas de distinta procedencia

AMINOACIDO	NUMERO DE RESIDUOS			
	A	B	C	D
Asx	140	159	145	81
Glx	180	163	140	91
Ser	94,5	65	272	81
His	43	37	67	20
Gly	103	147	233	120
Arg	83,5	54	4	41
Thr	67,5	53	55	133
Ala	161	143	151	80
Tyr	35	29	19	39
Met	20	4	3	17
Val	98,5	81	16	124
Phe	50			40
Ile	66,5	125	39	54
Leu	160	137	132	106
Lys	31	84	34	84
Cys	nd	11	12	15
Pro	nd	89	42	227
Trp	nd	18	39	17
TOTAL	1333	1399	1403	1370

A = Synechococcus 6301 (este trabajo); B = Tomate (9)  
 C = Cebada (9); D = Chlamydomonas reinhardtii (52).  
 nd = no determinado.

TABLA XVII

Donadores de electrones para la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301

DONADOR	CONCENTRACION	% ACTIVIDAD
FERREDOXINA <sup>(1)</sup>	20 $\mu$ M	100
FERREDOXINA <sup>(1)</sup>	10 $\mu$ M	89
FERREDOXINA + MV <sup>(1)</sup>	10 $\mu$ M + 1 mM	49
FD-NADP REDUCTASA + FERREDOXINA + NADPH <sup>(4)</sup>	600 mU 30 $\mu$ M + 1,2 mM	31
METILVIOLOGENO <sup>(2)</sup>	10 mM	18
METILVIOLOGENO <sup>(1)</sup>	1 mM	7
BENCILVIOLOGENO <sup>(2)</sup>	10 mM	2
BENCILVIOLOGENO <sup>(1)</sup>	1 mM	0,6
RIBOFLAVINA <sup>(1)</sup>	1 mM	0
FMN <sup>(1)</sup>	1 mM	0
FAD <sup>(1)</sup>	1 mM	0,5
NADPH <sup>(3)</sup>	2 mM	0,5
NADH <sup>(3)</sup>	2 mM	0,6

(1) y (2) El ensayo se lleva a cabo como se indica en el apartado II.C.1.2, salvo que la ferredoxina se sustituye por el donador indicado a la concentración que se especifica.

(2) La concentración de ditionito sódico se aumenta a 2 mg/ml

(3) El ensayo es como (1), salvo que ferredoxina y ditionito se sustituyen por el compuesto indicado, con el que se inicia la reacción.

(4) Las condiciones del ensayo son las que se especifican en la figura 25.



artificial de electrones metilviológeno resulta muy poco eficiente con la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 (menos de un 20% de la actividad con ferredoxina) incluso cuando se emplea a muy alta concentración. Tampoco es eficaz el bencilviológeno, compuesto de características semejantes al metilviológeno.

Cuando la ferredoxina presente en el ensayo se reduce mediante el sistema acoplado NADPH/ferredoxina-NADP reductasa de Anabaena 7119, se obtiene sólo un 30% de la actividad alcanzada con ferredoxina reducida químicamente. La reacción es además lineal durante un tiempo muy inferior (fig. 25), probablemente debido al aumento en la concentración de  $\text{NADP}^+$  en la mezcla de ensayo.

### III.B.3.2.2. Parámetros cinéticos de la glutamato sintasa purificada de Synechococcus 6301

#### III.B.3.2.2.1. Valores de las constantes de Michaelis ( $K_m$ ) para los distintos sustratos de la glutamato sintasa

Para estudiar la afinidad de la ferredoxina-glutamato sintasa por sus distintos sustratos, se ha realizado una serie de representaciones de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk,  $1/v$  frente a  $1/[S]$ ). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla XVIII.

Cabe destacar la alta afinidad que presenta la enzima por la ferredoxina, su donador fisiológico de electrones ( $K_m = 7 \mu\text{M}$ ). En cuanto al  $\alpha$ -cetoglutarato, el valor de la  $K_m$  que presentamos es el denominado "aparente" (28), ya que este sustrato resulta inhibitor al aumentar su concentración por encima de 1 mM (fig. 26). La  $K_m$  para la glutamina es de aproximadamente 0,7 mM, valor del orden de los obtenidos para la enzima procedente de otras fuentes.

Tomando como valor de actividad específica 30 U/mg proteína y asumiendo un peso molecular de 158 kDa, se calcula un número de recambio para la enzima de 4690 moles de glutamato formados por minuto y por mol de enzima.

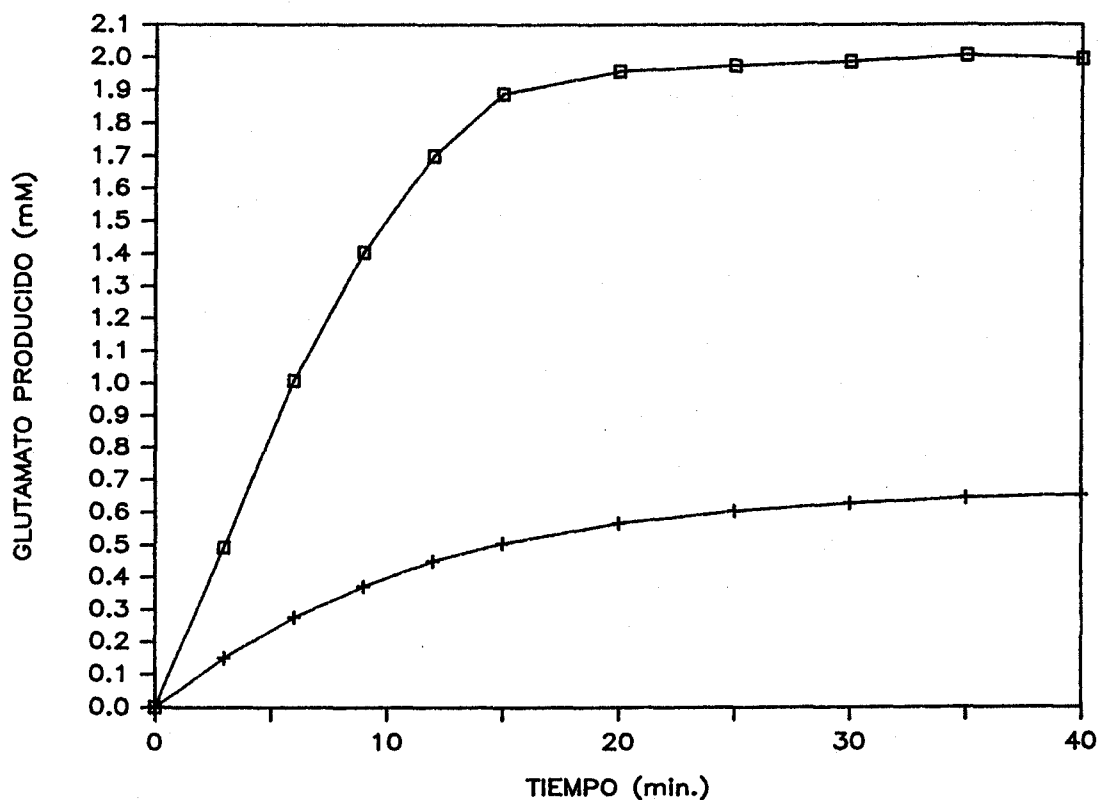


Figura 25: Cinética de la actividad glutamato sintasa de Synechococcus 6301 ensayada con ferredoxina reducida con ditionito sódico o con el sistema NADPH/Fd-NADP reductasa

El ensayo con ditionito es el estándar (apartado II.C.1.2), salvo que la ferredoxina se encuentra a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  (a).

La mezcla del ensayo acoplado (+) contiene, en 1 ml de volumen final: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 33  $\mu\text{mol}$ ; glutamina,  $\alpha$ -cetoglutarato y aminoacetoacetato a las concentraciones del ensayo estándar; NADPH, 1,2  $\mu\text{mol}$ ; Fd-NADP reductasa de Anabaena 7119, 600 mU; Tris-HCl, 2,5  $\mu\text{mol}$  y una cantidad adecuada de glutamato sintasa. La reacción se inicia por adición de 30 nmol de ferredoxina de Synechococcus 6301 en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5.

## TABLA XVIII

Parámetros cinéticos de la glutamato sintasa  
de Synechococcus 6301

---

Km FERREDOXINA	7,1 $\mu$ M
Km GLUTAMINA	0,7 mM
Km $\alpha$ -CETOGLUTARATO <sup>(1)</sup>	1,7 mM

---

Las condiciones de ensayo son las estándar (apartado II.C.1.2), excepto que el sustrato cuya Km se estudia se añade a distintas concentraciones no saturantes. Los datos de velocidad inicial obtenidos se representan en función de la concentración de sustrato utilizada en cada ensayo ( $1/v$  frente a  $1/[S]$ ) para determinar gráficamente el valor de la Km. El tiempo de ensayo es de 10 minutos.

(1) Km aparente, determinada por el método gráfico de Cleland (28).

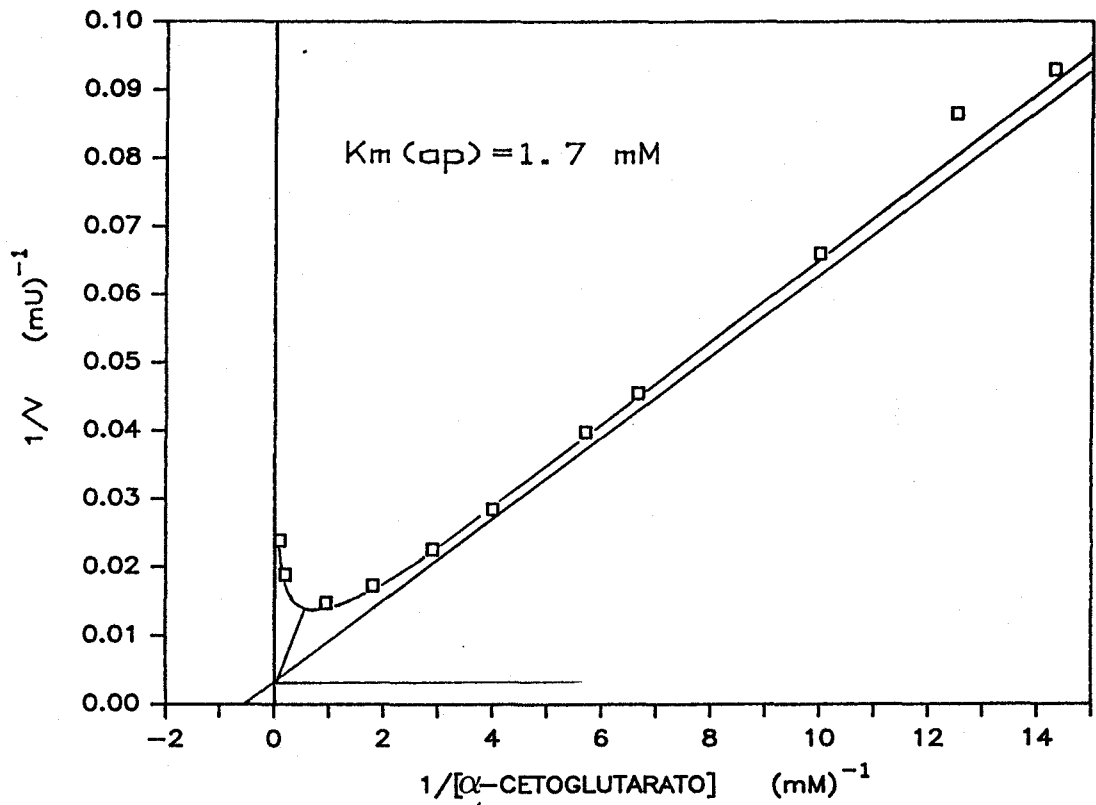


Figura 26:  $K_m$  para el  $\alpha$ -cetoglutarato de la glutamato sintasa purificada de *Synechococcus* 6301

Las condiciones de ensayo son las estándar (apartado II.C.1.2), salvo que la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato es la indicada en cada caso, y el tiempo de ensayo es de 10 minutos. Glutamato sintasa purificada, 5,6  $\mu\text{g}$  de proteína/ml ensayo.

### III.B.3.2.2.2. Efecto de temperatura y pH en el ensayo de la glutamato sintasa purificada de Synechococcus 6301

La figura 27a muestra el efecto que la temperatura de ensayo tiene sobre la actividad glutamato sintasa de una fracción purificada de la enzima. La temperatura óptima obtenida es de 42°C, cayendo por encima de este valor, probablemente por desnaturalización térmica de la proteína.

La figura 27b muestra la representación de Arrhenius de las velocidades determinadas a cada temperatura. Los puntos obtenidos se ajustan a dos rectas, ( $r_A^2 = 0,9948$  y  $r_B^2 = 0,9824$ ), habiéndose determinado que el punto de corte corresponde a una temperatura de 26°C.

A partir de las ecuaciones de las rectas de regresión A y B, se han calculado las energías de activación ( $E_a$ ) correspondientes, utilizando la fórmula:

$$E_a = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \ln (V_2/V_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Los valores de  $E_a$  obtenidos son de 67,3 KJ/mol y 35,5 KJ/mol respectivamente. Igualmente, se han calculado los valores de  $Q_{10}$  para ambos intervalos, encontrándose que son de 2,55 y 1,57.

Ensayado a 30°C, el pH óptimo de la glutamato sintasa es de 7,5 (tampón fosfato), coincidiendo con el determinado in situ (apartado III.B.1.5.1).

### III.B.3.2.2.3. Cinética de la actividad glutamato sintasa purificada

La constancia de la velocidad de producción de glutamato por la glutamato sintasa ensayada a 30°C no parece depender del tiempo, sino de la concentración de sustrato en la mezcla de ensayo. La figura 28 presenta una cinética obtenida con glutamato sintasa purificada. Se puede observar que la actividad es lineal con el tiempo durante los primeros 10 minutos, disminuyendo a partir de entonces. El tiempo durante el cual la

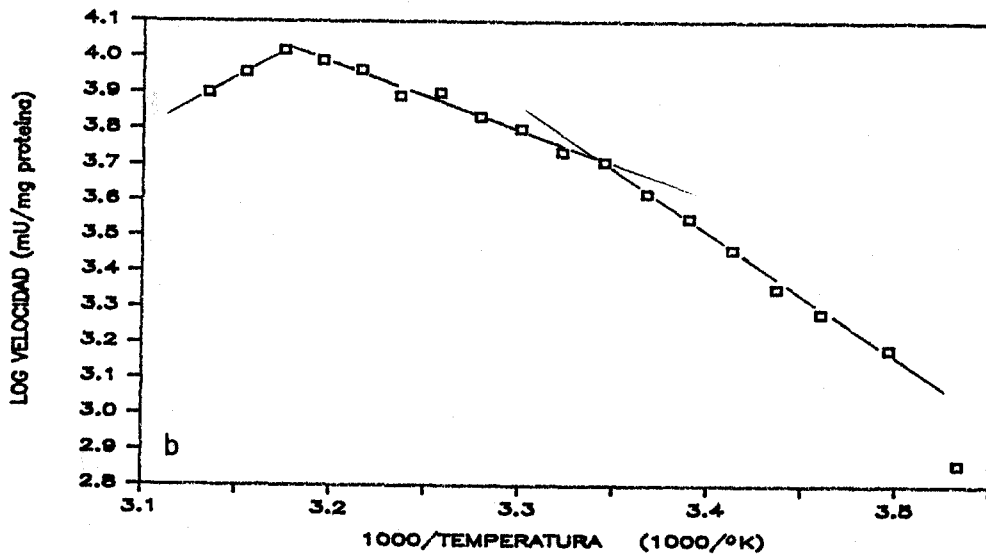
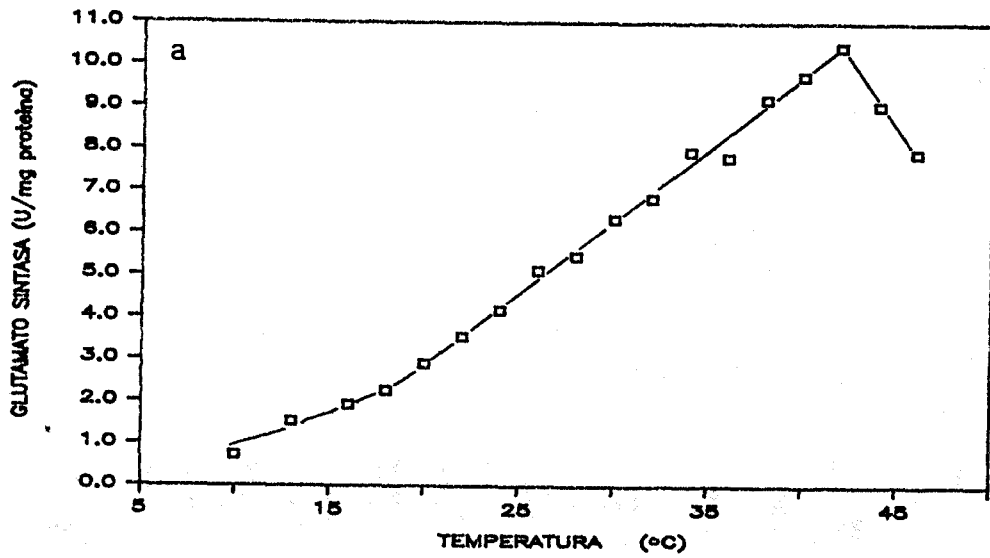


Figura 27: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

a) Las condiciones de ensayo son las mismas que las estándar (apartado II.C.1.2) excepto que la temperatura se modifica como se indica. Glutamato sintasa purificada, 5,5  $\mu\text{g}$  proteína/ml de ensayo.

b) Representación de Arrhenius de los datos de la figura a

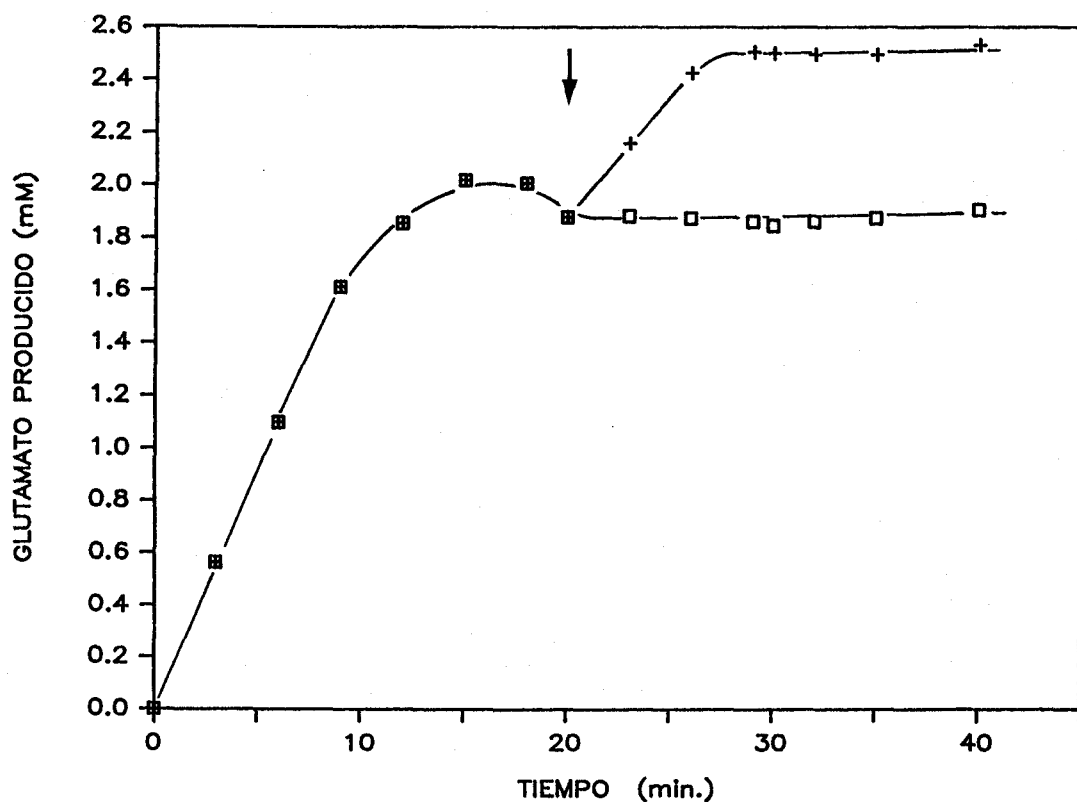


Figura 28: Cinética de la actividad glutamato sintasa de Synechococcus 6301. Efecto de la readición del sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato

Las condiciones de ensayo son las estándar (apartado II.C.1.2), salvo que la concentración inicial de  $\alpha$ -cetoglutarato es 1,6 mM. A los 20 minutos (flecha), se toma una fracción alícuota de 1,2 ml de la mezcla de ensayo y se le añaden 1,2  $\mu$ mol de  $\alpha$ -cetoglutarato (+). Control sin adición ( $\square$ ). Glutamato sintasa parcialmente purificada, 411  $\mu$ g proteína/ml ensayo.

actividad se mantiene constante varía de unos experimentos a otros, habiéndose observado valores que oscilan entre 8 y 40 minutos, dependiendo de la actividad enzimática presente. Sin embargo, en todos los casos se observa que, independientemente del tiempo, la linealidad se pierde cuando el  $\alpha$ -cetoglutarato remanente en la mezcla de ensayo, estimado a partir del valor de glutamato formado teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, baja hasta un valor del orden de 0,7 mM. Dos explicaciones son posibles para este fenómeno: el producto aparecido empieza a ser inhibitorio a partir de una determinada concentración, o bien la desaparición parcial de alguno de los sustratos impide que la reacción se de a velocidad máxima. Esto es especialmente importante en el caso del  $\alpha$ -cetoglutarato ya que, al ser este sustrato inhibitorio a concentraciones mayores de 1 mM, la concentración presente en el ensayo no es nunca saturante.

Los datos presentados en la tabla XIX permiten descartar la primera posibilidad. En efecto, se puede observar que el glutamato no empieza a ser inhibitorio en el ensayo hasta alcanzar concentraciones al menos iguales a las de glutamina, circunstancia que nunca se ha alcanzado cuando se pierde la linealidad.

El segundo supuesto es fácilmente comprobable añadiendo  $\alpha$ -cetoglutarato hasta la concentración de 1 mM una vez que ha empezado a disminuir la velocidad de aparición de glutamato. La figura 28 muestra cómo la readición de  $\alpha$ -cetoglutarato da lugar a la recuperación de la linealidad de la reacción. Sin embargo, la velocidad máxima obtenida es algo inferior a la inicial, tal vez por el largo tiempo de incubación de la proteína a 30°C.

### III.B.3.2.3. Efecto del tratamiento con inhibidores sobre la actividad glutamato sintasa

#### III.B.3.2.3.1. Efecto de la presencia de inhibidores en el ensayo

La tabla XX presenta el efecto de distintos inhibidores en el ensayo de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301. Se puede ver que de los análogos de glutamina empleados, el DON es el más efectivo, seguido de azaserina, inhibidor general de



TABLA XIX

Efecto de la concentración de glutamato y glutamina sobre la actividad glutamato sintasa de Synechococcus 6301

GLUTAMATO (mM)	GLUTAMINA (mM)	ACTIVIDAD (mU/ml)	%
0	1	13,5	100
0,1	1	13,7	101
0,5	1	13,5	100
1	1	12,7	94
5	1	6,45	48
0	5	31,8	100
0,1	5	30	94
0,5	5	31,1	98
1	5	31,9	100
5	5	27,8	87

Los ensayos se llevan a cabo como se indica en el apartado II.C.1.2, salvo que la concentración de glutamina es la que se indica y que se añade en cada caso la cantidad especificada de glutamato. La mezcla de ensayo no lleva aminooxiacetato. Glutamato sintasa purificada: 39  $\mu\text{g/ml}$  de ensayo.

TABLA XX

Efecto de inhibidores sobre el ensayo de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

INHIBIDOR	CONCENTRACION (mM)	% ACTIVIDAD
CONTROL	-	100
AZASERINA	1	3
"	0,05	51
ALBIZIINA	10	49
"	1	89
N-ACETIL-GLUTAMINA	10	79
"	1	101
GLUTAMATO- -HIDRAZIDA	10	94
SEMICARBAZIDA	10	63
HIDROXILAMINA	12	58
-BENCIL-GLUTAMATO	5	103
N-METIL-GLUTAMATO	5	96
DON <sup>(1)</sup>	0,1	0
"	0,01	75
MSX	5	97
FERROCINA <sup>(2)</sup>	5	61
" (2)	1	90

El ensayo se lleva a cabo como se indica en el apartado II.C.1.2 pero añadiendo la concentración del inhibidor indicada. El 100% de actividad corresponde a 24 mU, salvo en (1), 11,8 mU y (2), 8,1 mU.

amidotransferasas (25), y de albiziina, produciendo esta última una inhibición muy inferior. Semicarbazida e hidroxilamina, compuestos descritos como inhibidores de transaminasas (102), también parecen tener cierto efecto sobre la actividad de esta enzima. Otros posibles análogos de glutamina y glutamato no parecen afectar a los niveles de actividad cuando están presentes en el ensayo.

La ferrocina, empleada por su afinidad por el hierro (156), tiene muy poco efecto sobre la actividad cuando se emplea incluso a altas concentraciones, abogando contra la presencia de hierro en la proteína.

#### III.B.3.2.3.2. Efecto de algunos agentes modificadores de grupos funcionales sobre la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

La tabla XXI presenta los resultados obtenidos cuando se preincuba la proteína con algunos compuestos químicos. Podemos ver que de los reactivos de grupos sulfhidrilos empleados, el más efectivo es el PHMB, aunque son necesarias altas concentraciones para obtener un efecto significativo. Ninguno de los otros reactivos de grupos sulfhidrilos empleados parece afectar a la actividad glutamato sintasa, como tampoco lo hacen los reactivos quelantes de metales. El mayor grado de inactivación se consigue con el piridoxal-5'-fosfato, agente químico que reacciona preferentemente con residuos de lisina (grupo  $\epsilon$ -amino, 38), lo que sugiere la posible presencia de este residuo de aminoácido en alguna zona de la enzima esencial para la catálisis. La ciclohexanodiona, que reacciona preferentemente con residuos de arginina, no tiene efecto negativo alguno sobre la actividad.

#### III.C. EFFECTO DE TRANSICIONES LUZ-OSCURIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA-SINTETASA DE Synechococcus 6301

La modulación luz-oscuridad de muchas actividades enzimáticas en organismos fotosintéticos es un fenómeno

TABLA XXI

Efecto de algunos agentes modificadores de grupos funcionales sobre la glutamato sintasa de Synechococcus 6301

AGENTE	CONCENTRACION (mM)	% ACTIVIDAD
NINGUNO	-	100
P-HMB <sup>(1)</sup>	0,1	104
P-HMB <sup>(1)</sup>	0,5	41
KCN	1	101
NaN <sub>3</sub>	1	101
bato-FENANTROLINA	1	95
bato-CUPROINA	1	103
$\alpha$ - $\alpha'$ -DIPIRIDILO	1	109
N-ETILMALEIMIDA	1	96
ODOACETATO	1	104
ODOACETAMIDA	1	96
DTNB	1	111
PIRIDOXAL-FOSFATO	3	66
CICLOHEXANODIONA	3	93

Antes de la incubación, las muestras se filtran según se indica en el apartado II.E.7. para cambiar el tampón A por fosfato potásico 50 mM, pH 7,5.

2,5  $\mu$ l de cada inhibidor se añaden a una solución de 25  $\mu$ l de la enzima filtrada para obtener la concentración final indicada. La suspensión se incuba 15 minutos a 4°C, tras lo cual se ensaya siguiendo el procedimiento estándar (apartado II.C.2.)

El 100% de actividad corresponde a 6,3 mU/ml de ensayo.

(1) Dado que el pHMB precipita en fosfato, el tampón de las muestras se cambia por HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,5. Los volúmenes de muestra e inhibidor en este caso y para la ciclohexanodiona son 4 veces mayores. El 100% de actividad corresponde a 11,8 y 7,2 mU por ml de ensayo, respectivamente.

ampliamente descrito y estudiado para las enzimas encargadas de la fijación y asimilación del carbono (5, 24, 73). El estudio está sin embargo mucho menos extendido en el campo de la asimilación del nitrógeno inorgánico (entrada y asimilación de nitrato, incorporación de amonio a esqueletos carbonados, etc...), donde los datos disponibles son escasos e incompletos.

Por otra parte, es poco lo que se conoce sobre el proceso de inactivación por oscuridad de las enzimas que responden a fotomodulación (139), ya que los trabajos se han centrado en el mecanismo de activación de enzimas, ya sea por luz (ciclo de Calvin) como por oscuridad (ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato, etc...).

El estudio que se presenta a continuación describe el comportamiento de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 en respuesta a distintas condiciones de iluminación, tanto en lo que respecta a su inactivación por oscuridad como a su reactivación por luz.

### III.C.1. Inactivación por condiciones de oscuridad

#### III.C.1.1. Cinética de inactivación

Las células de Synechococcus 6301 presentan niveles altos de actividad glutamina sintetasa (GS) cuando crecen en condiciones de luz saturante y con nitrato como única fuente de nitrógeno. Estos niveles oscilan alrededor de 1,5 U/mg de proteína (actividad transferasa) o de 90 mU/mg de proteína (actividad biosintética), y se mantienen aproximadamente constantes a lo largo de las primeras fases de crecimiento.

Cuando estos cultivos se transfieren a la oscuridad, se produce una disminución progresiva de los niveles de actividad glutamina sintetasa, alcanzando, después de dos horas, valores de un 20% de la actividad inicial. La figura 29 muestra la cinética de bajada de los niveles de la glutamina sintetasa, que se observa tanto determinando la actividad transferasa como la biosintética. Existe un buen paralelismo entre los valores de actividad obtenidos de ambas formas a lo largo del tiempo de tratamiento, por lo que los cambios observados en la actividad

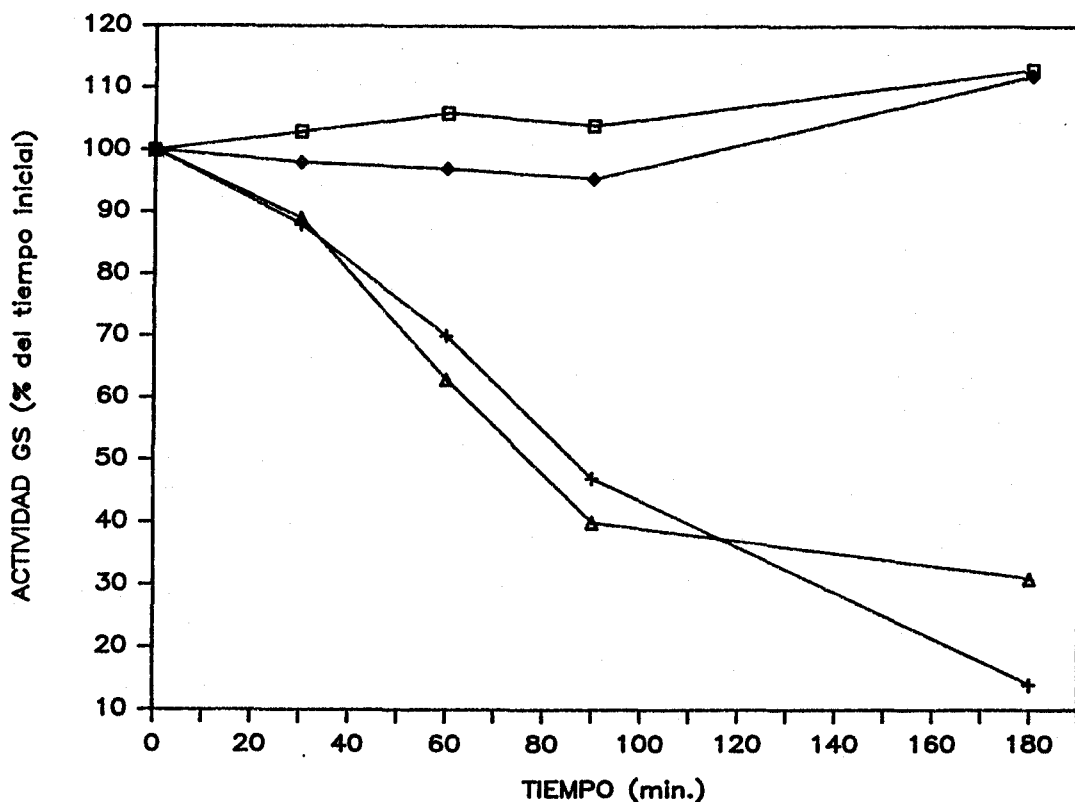


Figura 29: Efecto de la oscuridad sobre las actividades transferasa y biosintética de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 determinada in situ

Un cultivo de células de Synechococcus 6301 creciendo en la luz y conteniendo  $9,9 \mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en dos fracciones, que se ponen a cultivar en las siguientes condiciones: (□,◇) luz; (+,Δ) oscuridad. A los tiempos indicados, se determinan las actividades transferasa (□,+) y biosintética (Δ,◇) de la glutamina sintetasa como se indica en el apartado II.C.2.

El 100% de la actividad equivale a  $46,1 \text{ U/mg}$  clorofila (transferasa) y  $2,83 \text{ U/mg}$  clorofila (biosintética).

transferasa parecen reflejar variaciones reales en los niveles fisiológicos de glutamina sintetasa; ello nos permite utilizar en nuestro trabajo la actividad transferasa de la glutamina sintetasa para estudiar los cambios en los niveles de actividad de la enzima producidos por las condiciones de iluminación.

El tiempo medio de caída es de 60 minutos, presentando un retardo inicial de 15 a 20 minutos.

### III.C.1.2. Efecto de la fase de crecimiento del cultivo sobre el fenómeno de inactivación

La inactivación en la oscuridad de la glutamina sintetasa se produce únicamente cuando el cultivo se encuentra en una determinada fase de crecimiento. La figura 30 representa el grado de inactivación que un tratamiento de oscuridad produce sobre la glutamina sintetasa de células procedentes de cultivos de distinta edad, reflejada en una diferente densidad celular. Se puede ver que las células presentan una fase en su crecimiento durante la cual el fenómeno de pérdida de actividad glutamina sintetasa por oscuridad es muy drástico, siendo el efecto menor antes y después de este periodo, y nulo en la fase inicial de crecimiento.

La relación entre contenido en clorofila y fase de crecimiento del cultivo varía según las características de volumen y geometría del recipiente utilizado. Los datos presentados en la figura 30 corresponden a células cultivadas en frascos de Roux verticales (apartado II.A.2), en los cuales la fase exponencial de crecimiento es muy corta, debido probablemente a la limitación de luz. Sin embargo, las células cultivadas en tubos de 100 ml de capacidad máxima (apartado II.A.2) presentan una fase exponencial más larga, siendo la luz limitante a valores mayores de densidad celular. En estos cultivos, el mayor grado de inactivación se obtiene a un valor de clorofila del cultivo de aproximadamente 14-15  $\mu\text{g/ml}$ , superior al observado en cultivos en frasco de Roux. Esto indica que el grado de inactivación depende de la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo en el momento de pasar a oscuridad, y no estrictamente del contenido en clorofila del mismo.

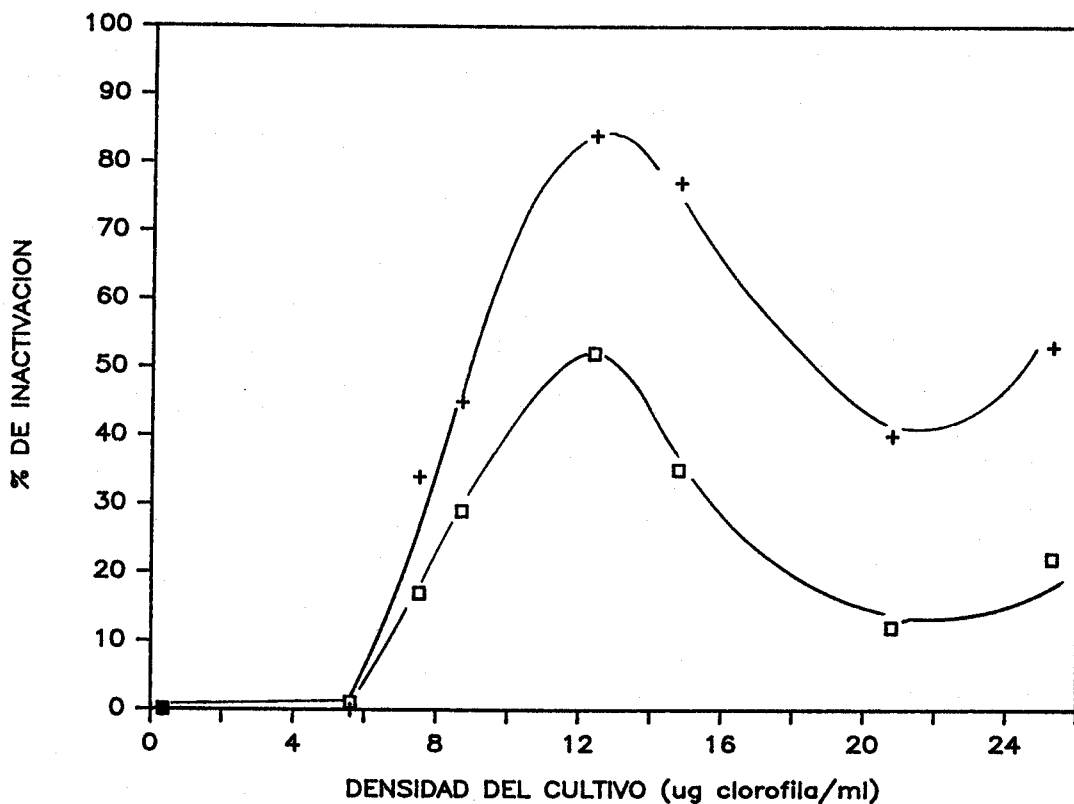


Figura 30: Efecto del contenido en clorofila del cultivo sobre la inactivación de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 por oscuridad

De un cultivo de células de Synechococcus 6301 creciendo en la luz se toman a distintos tiempos, correspondientes con una fase determinada de crecimiento (medido como  $\mu\text{g}$  clorofila/ml cultivo), muestras alícuotas de 40 ml, que se pasan inmediatamente a oscuridad con gaseo normal. Los puntos representan la inactivación obtenida en cada caso después de 60 (□) y 120 (+) minutos continuados de este tratamiento.



La dependencia de la fase de crecimiento del cultivo ha sido también observada en la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum para la inactivación por amonio o por oscuridad de su nitrogenasa (87), donde el grado de inactivación de la misma disminuye con la edad del cultivo. Sin embargo, en este caso, los autores no especifican la fase de crecimiento en que se encuentran los cultivos a cada una de las edades estudiadas.

### III.C.1.3. Estudio inmunológico de la inactivación

La pérdida de actividad glutamina sintetasa que se produce al pasar las células a la oscuridad se debe a un proceso de inactivación de la enzima, y no a degradación protéica. Efectivamente, cuando extractos obtenidos a partir de células incubadas bien a la luz bien cinco horas en la oscuridad, se someten a inmunolectroforesis cuantitativa frente a antisuero anti-GS de Synechococcus 6301, la cantidad de antígeno detectada en ambos casos es semejante (fig. 31 y tabla XXII), a diferencia de la actividad específica, inferior en los extractos procedentes de oscuridad. La glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 se encuentra asociada a membranas fotosintéticas (42), por lo que en la preparación de extractos, el contenido total de la enzima se reparte entre la fracción soluble (sobrenadante) y la unida a membrana (sedimento). La figura 31 (también tabla XXII) muestra, además, que las proporciones de antígeno soluble y unido a membrana son igualmente semejantes en los extractos de ambas procedencias.

De los datos obtenidos con antisuero se pueden extraer dos conclusiones. Por una parte, la bajada en los niveles de actividad glutamina sintetasa producida por oscuridad no conlleva degradación detectable de la enzima, siendo el proceso un fenómeno típico de inactivación post-traducciona. Por otra parte, la diferencia de actividad obtenida en luz y oscuridad no parece debida a una diferencia en la localización celular de la enzima en ambas condiciones (por ejemplo: si la enzima activa estuviese ligada a membrana, mientras la enzima soluble fuese inactiva). Sin embargo, la localización intracelular exacta de

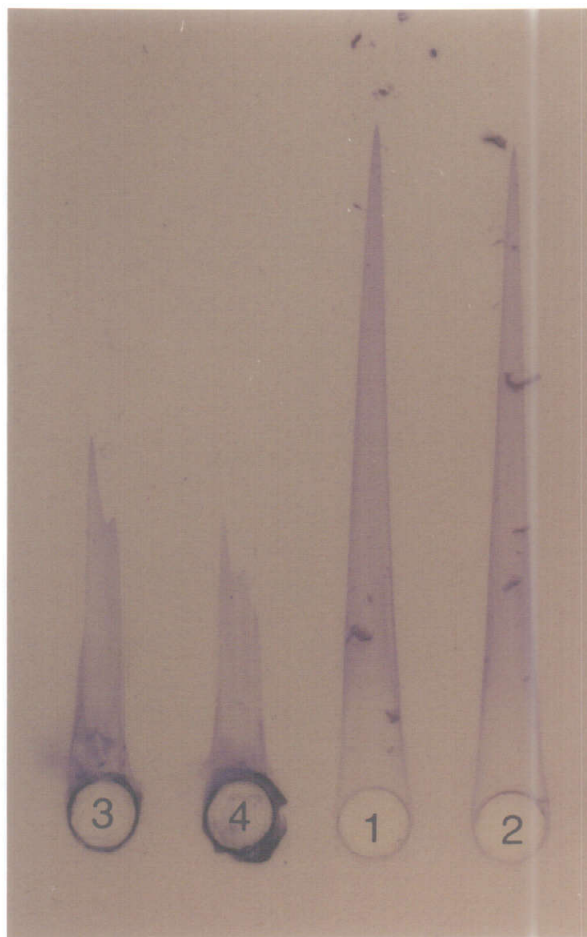


Figura 31: Inmunolectroforesis cuantitativa de extractos de células de Synechococcus 6301 procedentes de cultivos iluminados o incubados en oscuridad

Un cultivo de células creciendo a la luz ( $12,2 \mu\text{g}$  de clorofila/ml) se divide en dos fracciones de 300 ml, una de las cuales se pone a cultivar en oscuridad con gaseo normal. A las 5 h, la actividad determinada *in situ* de ambas suspensiones es 37 U/mg clorofila (luz) y 2 U/mg clorofila (oscuridad). Entonces se recogen 250 ml de cada fracción y se resuspenden con 4,5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, conteniendo PMSF 1 mM. Ambas suspensiones se someten a rotura por ultrasonidos durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugan a  $18.000 \times g$  durante 15 minutos, resuspendiéndose los sedimentos con 0,5 ml del mismo tampón.

La inmunolectroforesis se lleva a cabo como se indica en el apartado II.E.4.5, con 10  $\mu\text{l}$  de muestra por pocillo. Contenido de proteína: (1) sobrenadante, luz: 103 mg/ml; (2) sobrenadante, oscuridad: 95,5 mg/ml; (3) sedimento, luz: 228 mg/ml y (4) sedimento, oscuridad: 348 mg/ml.

TABLA XXII

Relación entre proteína glutamina sintetasa y actividad  
especifica presentes en extractos de Synechococcus 6301  
procedentes de luz y oscuridad

FRACCION	AREA ESPECIFICA		ACTIVIDAD ESPECIFICA	
	(U relat./mg prot.)		(U/mg prot.)	
	LUZ	OSCURIDAD	LUZ	OSCURIDAD
SOBRENADANTE	2,335	2,330	74,17	20,9
SEDIMENTO	0,596	0,316	118,86	27,6

Las condiciones son las que se indican en la figura 31.

las dos formas de la enzima debe determinarse con estudios al microscopio electrónico (15), ya que el método empleado para la obtención de extractos, muy drástico, puede alterar la distribución inicial de las proteínas de membrana.

Los cocientes actividad/área (actividad específica por proteína GS) que se deducen de la tabla XXII presentan una marcada diferencia entre sobrenadante y sedimento. Esto es probablemente debido a una solubilización incompleta de la proteína unida a membrana en la fracción sedimento, pese al tratamiento empleado para ello previamente a la electroforesis y a que ésta se llevó a cabo en presencia de detergente. (Efectivamente, una vez finalizada la inmunoelectroforesis, se observaban restos de extracto aglutinados en los pocillos correspondientes a ambos sedimentos).

Un fenómeno observado repetidamente en la preparación de extractos de células procedentes de la oscuridad es la reactivación total o parcial de la enzima durante el tratamiento de rotura celular. La tabla XXII muestra un nivel medio de actividad glutamina sintetasa en el extracto procedente de oscuridad de un 25% de su control en la luz. Sin embargo, en las células de partida mantenidas 5 horas en la oscuridad, la actividad determinada in situ era de sólo un 5% de su control a la luz.

#### III.C.1.4. Efecto de inhibidores de síntesis protéica sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad

Para estudiar la naturaleza del fenómeno de inactivación, hemos llevado a cabo una serie de experimentos utilizando cloranfenicol o rifampicina como agentes bloqueantes de la síntesis de proteína a nivel de traducción o transcripción, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 32 y 33: se puede observar que ambos antibióticos añadidos en el momento de pasar las células a la oscuridad previenen la inactivación producida por ésta. El efecto protector se obtiene, igualmente, si los inhibidores se añaden una vez que el proceso de inactivación se ha iniciado, manteniéndose entonces la actividad

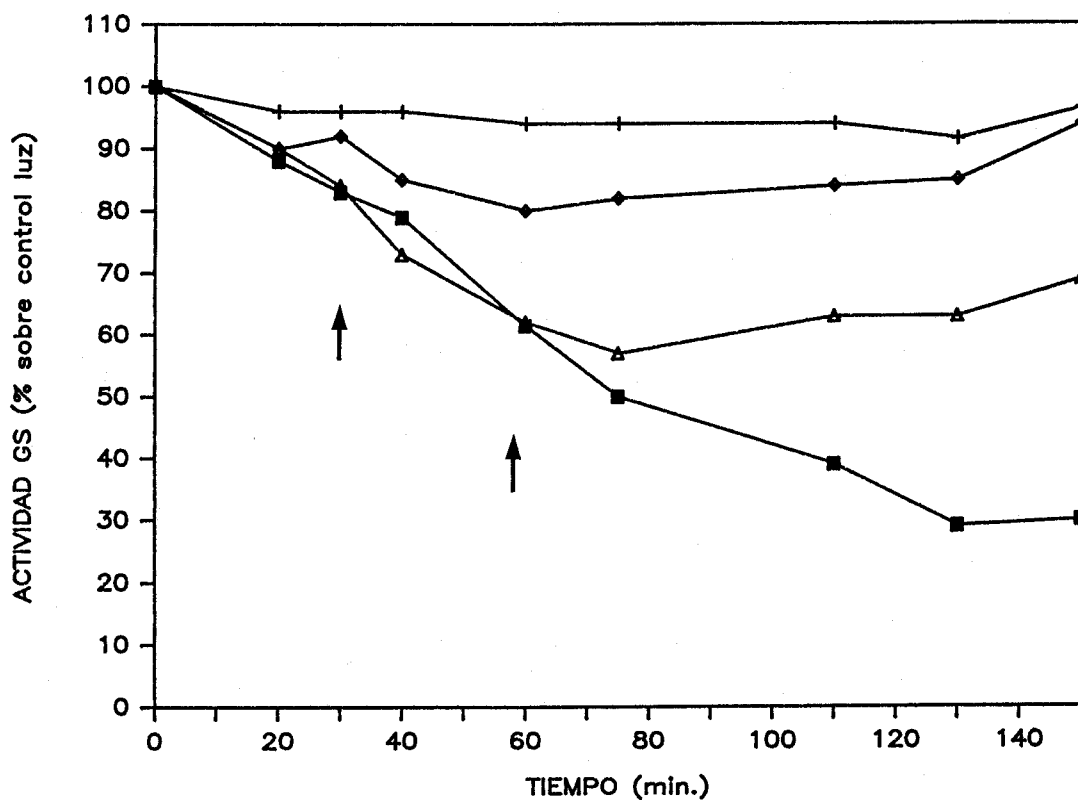


Figura 32: Efecto de la adición de cloranfenicol a distintos tiempos sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad

Un cultivo de células de *Synechococcus* 6301 creciendo en la luz y conteniendo 9,75  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en cinco fracciones, que se ponen a cultivar en las siguientes condiciones: (+) oscuridad con 75  $\mu\text{g}$  cloranfenicol/ml disueltos en metanol a tiempo 0; (◆) oscuridad con cloranfenicol a los 30 minutos de incubación; (Δ) oscuridad con cloranfenicol a los 60 minutos de incubación; (■) oscuridad con un volumen equivalente de metanol. El control (100%) se mantiene iluminado. A los tiempos indicados se ensaya la actividad transferasa como se indica en el apartado II.C.2.1. El 100% de actividad corresponde a 61,5 U/mg de clorofila.

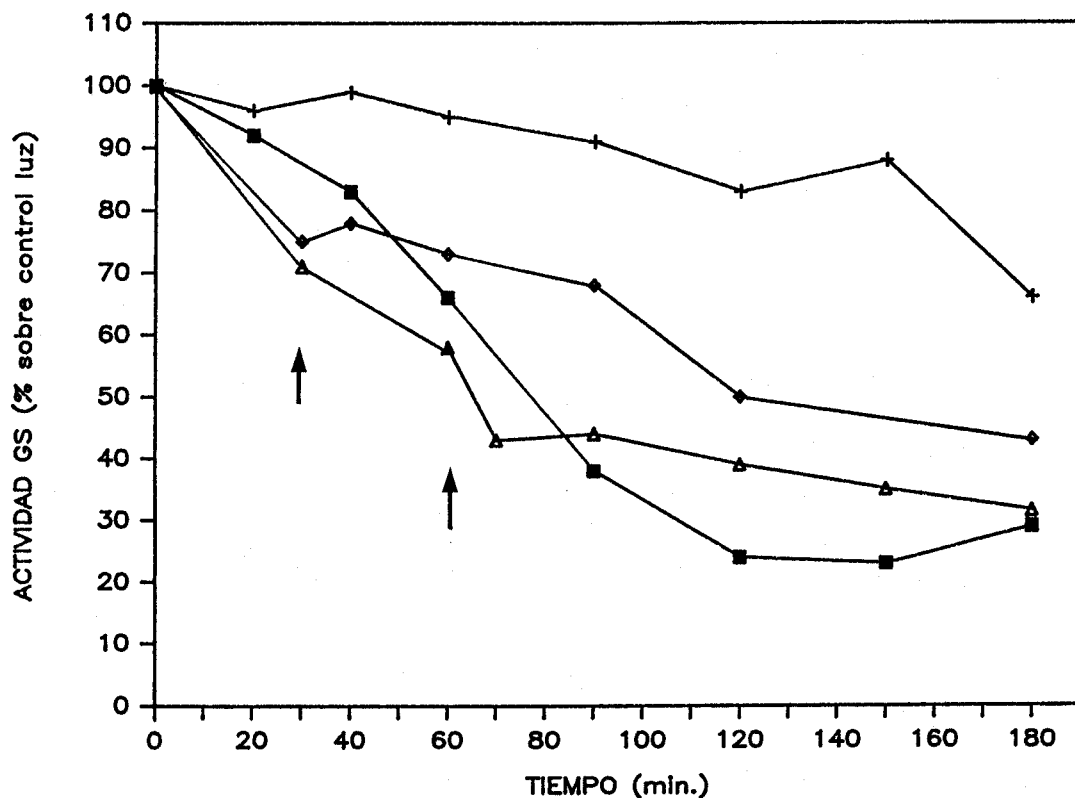


Figura 33: Efecto de la adición de rifampicina a distintos tiempos sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad

Un cultivo de células de *Synechococcus* 6301 creciendo en la luz y conteniendo 9,2  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en cinco fracciones, que se ponen a cultivar en las siguientes condiciones: (+) oscuridad con 20  $\mu\text{g}$  rifampicina/ml disueltos en metanol a tiempo 0; (◊) oscuridad con rifampicina a los 30 minutos de incubación; (Δ) oscuridad con rifampicina a los 60 minutos de incubación; (■) oscuridad con un volumen equivalente de etanol. El control (100%) se mantiene iluminado. A los tiempos indicados se ensaya la actividad transferasa como se indica en el apartado II.C.2.1. El 100% de actividad corresponde a 50 U/mg de clorofila.

en los niveles alcanzados en el momento de la adición, o incluso aumentando ligeramente en el caso del cloranfenicol (fig. 32). La rifampicina, sin embargo, parece cesar su efecto una vez transcurridos unos 90 minutos desde su adición, permitiendo finalmente cierta inactivación de la glutamina sintetasa, aunque a una velocidad muy inferior (fig. 33). Esto podría ser debido a una degradación del antibiótico, ya que se observa que su color anaranjado característico se oscurece después de cierto tiempo de incubación. La readición tanto de cloranfenicol como de rifampicina a los cultivos en este momento consigue prevenir esta caída.

Hasta donde sabemos, no se ha descrito aún ningún mecanismo de modulación enzimática por luz-oscuridad que presente estas características. Los resultados obtenidos con los inhibidores de síntesis de proteína parecen indicar la necesidad de síntesis de algún factor protéico para iniciar la inactivación de la glutamina sintetasa en la oscuridad. Sin embargo, el efecto casi inmediato que tienen estos mismos inhibidores cuando se añaden una vez iniciado el proceso de inactivación ponen en tela de juicio esta interpretación, que implicaría una velocidad muy elevada de degradación de la supuesta proteína inactivadora (recambio rápido). Por otra parte se podrían interpretar estos resultados en términos de síntesis de una proteína no enzimática que ejerciera su efecto inactivador uniéndose a la glutamina sintetasa. Se podría pensar también en un mecanismo que implicase variaciones en los niveles intracelulares de metabolitos como responsable indirecto del efecto de ambos inhibidores. Estas posibilidades se discutirán posteriormente (apartado IV.C).

#### III.C.1.5. Efecto de inhibidores de fotosíntesis sobre la inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad

El efecto más evidente de la oscuridad en una cianobacteria es la detención del proceso fotosintético. En este sentido, hemos intentado simular las condiciones de oscuridad empleando algunos inhibidores. La figura 34 muestra el efecto que tiene sobre la actividad glutamina sintetasa determinada in situ el DCMU, inhibidor del flujo de electrones entre los

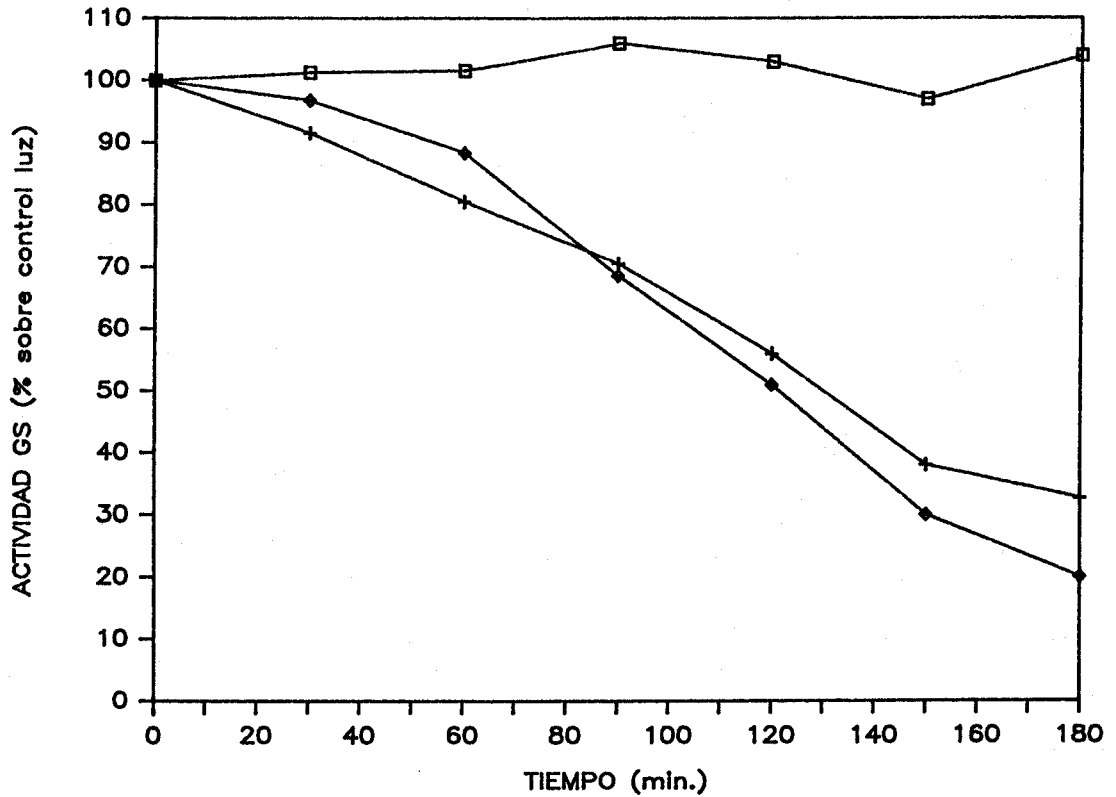


Figura 34: Efecto de DCMU u oscuridad sobre la actividad glutamina sintetasa de células de Synechocystis 6301

Un cultivo de células de Synechococcus 6301 creciendo en la luz y conteniendo 13,6  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en cuatro fracciones, que se ponen a cultivar en las siguientes condiciones: (◇) luz con 20  $\mu\text{M}$  de DCMU; (+) oscuridad; (□) luz con 20  $\mu\text{M}$  de DCMU y 75  $\mu\text{g}$  de cloranfenicol/ml. El control (100%), no representado, se mantiene a la luz sin adición. A los tiempos indicados, se ensaya la actividad transferasa de cada uno de los cultivos. El 100% de la actividad corresponde a 46,2 U/mg de clorofila.



fotosistemas II y I (66), que no altera la fotofosforilación cíclica (91). La adición de 20  $\mu\text{M}$  de DCMU a células de Synechococcus 6301 creciendo en la luz produce un efecto similar al de la oscuridad, siendo el proceso de nuevo sensible al inhibidor de síntesis de proteínas cloranfenicol. Esto parece indicar que en la señal desencadenante de la inactivación de la glutamina sintetasa interviene la eliminación del flujo fotosintético entre PSII y PSI.

El sistema benzoquinona/ferricianuro, capaz de captar electrones a nivel de las quinonas (165) y por lo tanto de interrumpir el flujo de electrones hacia el PSI, produce un efecto semejante al del DCMU o de la oscuridad (tabla XXIII).

La interrupción del flujo de electrones entre los dos fotosistemas tiene como consecuencia un corte en el suministro de poder reductor para el metabolismo celular, simultáneamente con una parada en la generación fotosintética no cíclica de enlaces fosfato ricos en energía (ATP) como consecuencia de la ausencia del gradiente de protones necesario para ello. La inactivación podría ser debida, por tanto, a ausencia de los niveles adecuados de ATP; sin embargo, la tabla XXIII muestra que el DCCD, inhibidor irreversible de ATPasas (56, 151) no tiene por sí solo ningún efecto sobre la glutamina sintetasa de células de Synechococcus 6301 creciendo a la luz. En consecuencia, el efecto producido tanto por oscuridad como por el inhibidor DCMU y el sistema benzoquinona/ferricianuro sobre la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 puede interpretarse en términos de un cese en el aporte de poder reductor, que podría ser el desencadenante del mecanismo de inactivación, como se ha descrito para la regulación por luz de otras enzimas de este y otros organismos (5, 37, 163).

Por otra parte, la adición a células de Synechococcus 6301 creciendo a la luz del agente desacoplante del flujo fotosintético CCCP (113) empleado a concentraciones descritas como inhibidoras del desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de  $\text{CO}_2$  en Synechococcus 6301 (43), o de la síntesis de ATP en A. cylindrica (21), no tiene ningún efecto sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa. Es de esperar que en presencia de este inhibidor se consuman las reservas de ATP de la célula, manteniéndose sin embargo un ambiente reductor en el

TABLA XXIII

Efecto de compuestos que afectan al flujo fotosintético sobre la actividad glutamina sintetasa de Synechococcus 6301

ADICION	CONCENTRACION	%ACTIVIDAD A LOS 60 MIN.
Ninguna	-	100
DCCD	20 $\mu$ M	95
CCCP	20 $\mu$ M	93
BENZOQUINONA + FERRICIANURO	20 $\mu$ M 2 mM	20

La actividad glutamina sintetasa se determina in situ en células creciendo a la luz (11,8  $\mu$ g clorofila/ml) tras 60 minutos del tratamiento indicado a las concentraciones que se especifican. El 100% de actividad corresponde a 42 U/mg de clorofila.

interior celular, que impediría la inactivación de la enzima.

Todo ello sugiere que ni los niveles de síntesis de ATP ni el gradiente electroquímico de protones intervienen en el proceso de inactivación de la enzima.

### III.C.2. Reactivación por luz de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad

#### III.C.2.1. Cinética de la reactivación de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad

Cuando células de Synechococcus 6301 cuyos niveles de actividad glutamina sintetasa han disminuido en un 80% tras ser incubadas varias horas en la oscuridad (por ejemplo último punto en la fig. 29) se vuelven a iluminar, se recupera rápidamente el nivel típico de actividad que presentan en la luz (fig. 35). El tiempo medio de este proceso es menor de 10 minutos en condiciones de cultivo, alcanzándose tras 15 minutos de iluminación hasta un 85% de la actividad total. La recuperación de los niveles de glutamina sintetasa se produce a la misma velocidad en las actividades transferasa y biosintética, lo que refleja de nuevo el carácter fisiológico de este proceso de regulación de la enzima. El tiempo de reactivación puede reducirse si la reiluminación se lleva a cabo a una intensidad mayor de luz, siendo de sólo 5 minutos a  $400 \text{ W/m}^2$ .

La rapidez con la que se recuperan los niveles iniciales de actividad glutamina sintetasa al reiluminar las células confirma la presencia de un mecanismo de reactivación de la enzima ya presente en la célula, descartando por tanto un fenómeno de síntesis de novo.

#### III.C.2.2. Efecto de inhibidores sobre la reactivación por luz de la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad

El tratamiento con inhibidores de síntesis de proteína

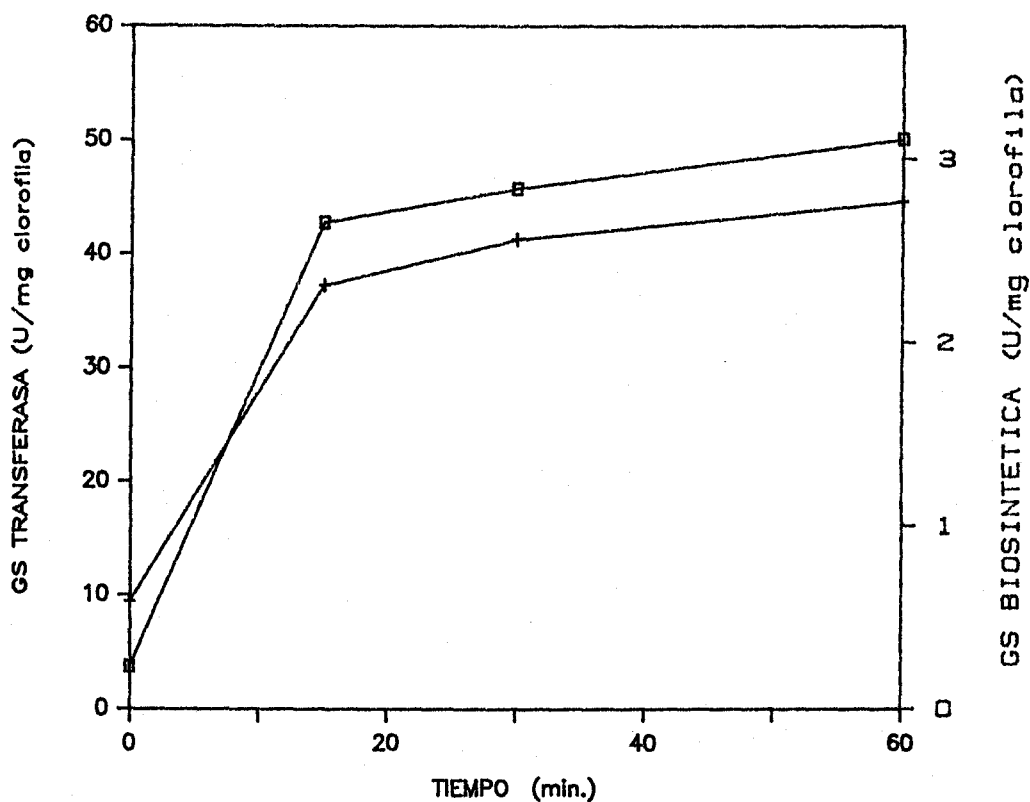


Figura 35: Reactivación por luz de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 inactivada por oscuridad

Un cultivo de células de Synechococcus 6301 creciendo en la luz, conteniendo 9,9  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml y con una actividad de 46,1 U/mg clorofila (transferasa) ó 2,83 U/mg clorofila (biosintética) se transfiere a oscuridad durante 6,5 h, tras las cuales se vuelve a iluminar, determinándose las actividades transferasa ( $\square$ ) y biosintética (+) de la glutamina sintetasa a los tiempos indicados, tal como se especifica en el apartado II.C.2.

confirma la ausencia de un mecanismo de síntesis de novo. La tabla XXIV muestra cómo la reactivación de la enzima es insensible a la presencia de cloranfenicol o rifampicina, obteniéndose tras 30 minutos de iluminación el mismo valor de actividad que sin ninguna adición. Estos resultados sugieren un mecanismo de inactivación reversible de la glutamina sintetasa activado por alternancia de periodos de luz-oscuridad. Por otra parte, si células de Synechococcus 6301 procedentes de oscuridad y reiluminadas tras tratamiento con cloranfenicol hasta alcanzar los niveles iniciales de actividad glutamina sintetasa, se someten de nuevo a un tratamiento de oscuridad (fig. 36), se observa nuevamente que el inhibidor de síntesis protéica previene de la inactivación.

La adición de 20  $\mu$ M de DCMU al reiluminar las células previene totalmente la reactivación de la GS (fig. 37). Por otra parte, el CCCP no afecta al proceso, mientras que el DCCD es incapaz de evitar la rápida reactivación inicial de la enzima y sólo impide que se alcancen los niveles máximos de actividad que se obtienen sin adición (fig. 38).

De nuevo, los resultados parecen implicar al flujo fotosintético de electrones. Es necesario que exista un transporte de electrones entre ambos fotosistemas para que tenga lugar la reactivación de la enzima, siendo ésta independiente de síntesis de ATP. El efecto tardío que se observa con DCCD podría indicar un bloqueo lento del flujo fotosintético de electrones como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ATP, con la consiguiente incapacidad para seguir sintetizando poder reductor.

Todos estos datos indican que el efecto reactivante de la luz podría atribuirse a la rápida recuperación de los niveles de compuestos reducidos que ocurre como consecuencia del restablecimiento del flujo fotosintético de electrones tras iluminar las células.

### III.C.2.3. Efecto del tratamiento in vitro con ditiolos y tiorredoxina sobre la glutamina sintetasa inactivada in vivo por oscuridad

De los resultados obtenidos en los estudios fisiológi-

TABLA XXIV

Efecto de inhibidores de síntesis de proteína sobre la reactivación por luz de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301

ADICION	% ACTIVIDAD A LOS 30 MINUTOS
ninguna	100
CLORANFENICOL (70 µg/ml)	92
RIFAMPICINA (20 µg/ml)	101

A células mantenidas en oscuridad durante 2,5 h (rifampicina) ó 4 h (cloranfenicol) y cuyos niveles de actividad son 12,3 y 9,5 U/mg clorofila respectivamente, se les añade el inhibidor disuelto en metanol y 25 minutos después se iluminan, determinándose la actividad 30 minutos más tarde. Al control se le añade un volumen equivalente de metanol.

El 100% de actividad corresponde a 50,5 U/mg clorofila (RIF) ó 46,3 U/mg clorofila (CAF).

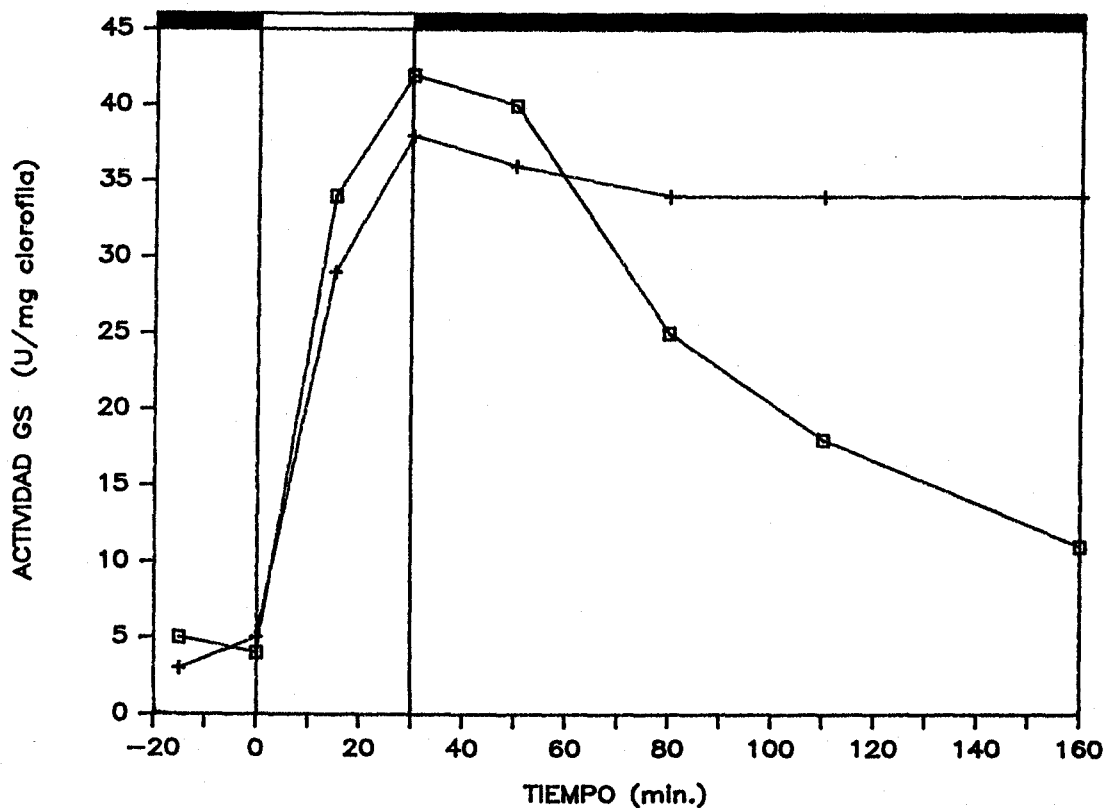


Figura 36: Efecto de la presencia de cloranfenicol en la reactivación por luz sobre una posterior inactivación por oscuridad de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301

Un cultivo de células de *Synechococcus* 6301 creciendo a la luz y conteniendo 16,5  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en dos fracciones que se transfieren a la oscuridad durante 17 h, tras lo que se añade a una de ellas 75  $\mu\text{g}$  de cloranfenicol/ml (+) o la cantidad correspondiente de metanol (□). Después de 15 minutos, ambas fracciones se iluminan durante 30 minutos y se vuelven a transferir a la oscuridad. A los tiempos indicados, se determina la actividad transferasa de cada uno de los cultivos (apartado II.C.2.1).

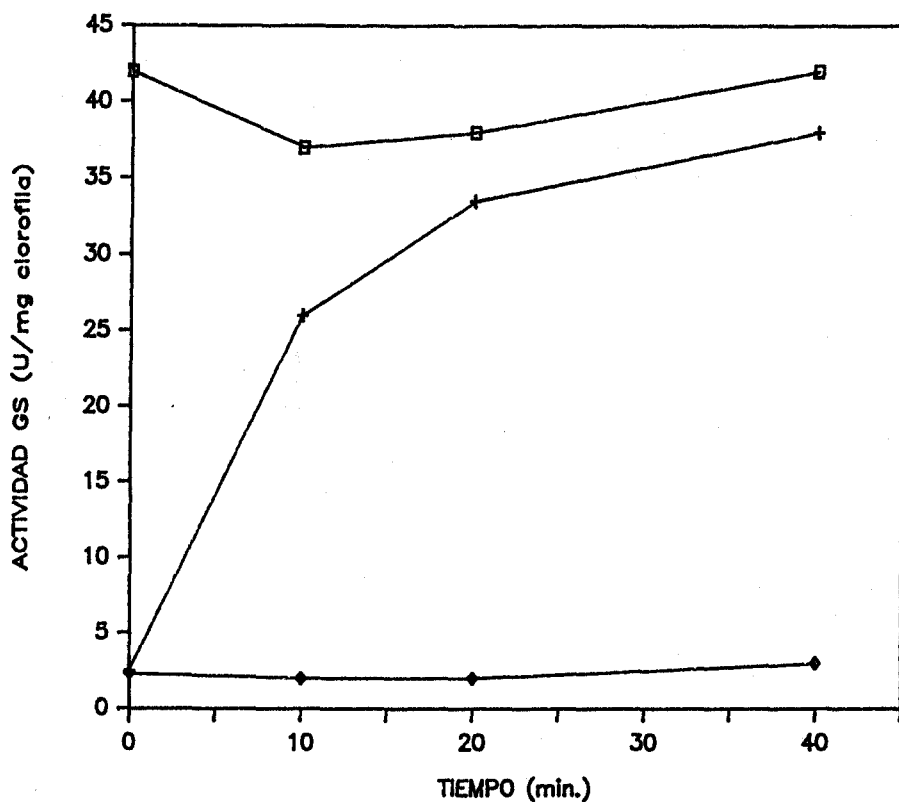


Figura 37: Efecto del DCMU sobre la reactivación por luz de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301 inactivada por oscuridad

Un cultivo de células de *Synechococcus* 6301 creciendo a la luz y conteniendo 19,5  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se divide en tres fracciones. Dos de ellas se transfieren a la oscuridad durante 18 h, tras lo que se añade a una de ellas 20  $\mu\text{M}$  de DCMU en etanol ( $\diamond$ ) y a la otra un volumen equivalente de etanol (+). Posteriormente, ambas se vuelven a iluminar. (o) células mantenidas constantemente a la luz, sin adición.

A los tiempos indicados, se determina la actividad transferasa de cada uno de los cultivos según se describe en el apartado II.C.2.1.



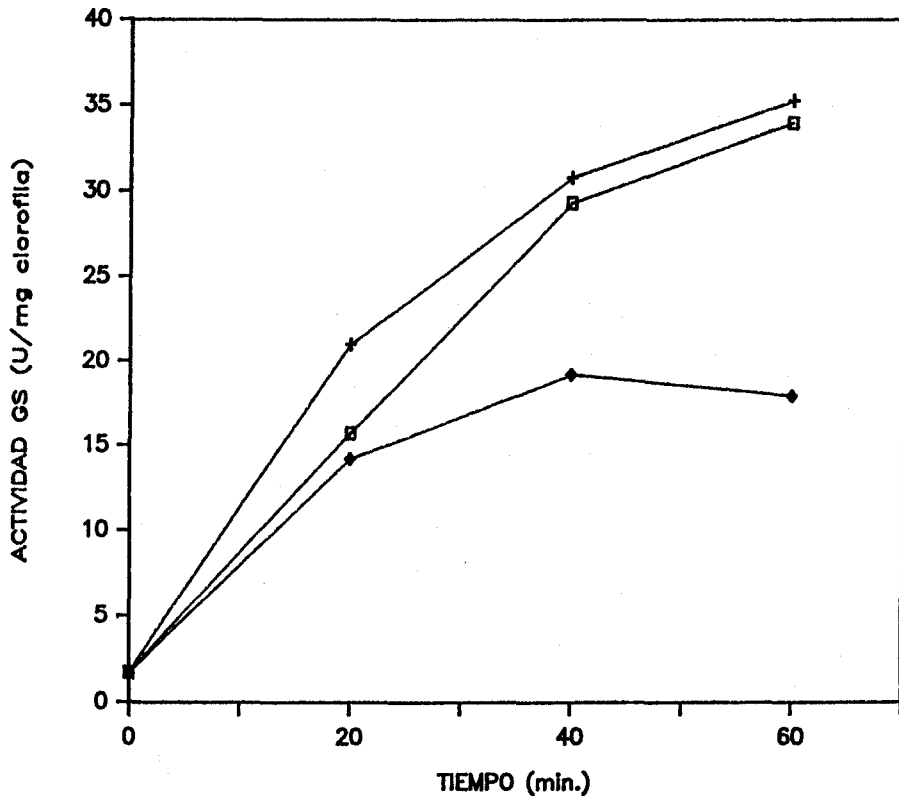


Figura 38: Efecto de la presencia de DCCD y CCCP sobre la reactivación por luz de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301 inactivada por oscuridad

Un cultivo de células de *Synechococcus* 6301 creciendo en la luz y conteniendo 14,4  $\mu\text{g}$  clorofila/ml se transfiere a la oscuridad durante 5,5 h, tras lo que se divide en tres fracciones, que se reiluminan con las siguientes adiciones: con 10  $\mu\text{M}$  de CCCP en metanol (+); con 20  $\mu\text{M}$  de DCCD en metanol ( $\diamond$ ); con un volumen equivalente de metanol ( $\square$ ). A los tiempos indicados, se determina la actividad transferasa de la glutamina sintetasa tal como se indica en II.C.2.1.

cos expuestos hasta ahora se puede deducir que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la regulación de los niveles de actividad glutamina sintetasa por luz implica, de alguna forma, una variación en el estado redox de la célula.

Algunos de los mecanismos de regulación luz-oscuridad descritos para las enzimas fotorregulables de otros organismos se basan en un fenómeno de oxidación/reducción de puentes disulfuro (73), sobre el que se han construido varios modelos teóricos. Uno de ellos, sistema ferredoxina-tiorredoxina, explica los fenómenos de inactivación-reactivación por reacciones de oxido-reducción de puentes disulfuro en la enzima regulada, mediadas por la tiorredoxina. Esto se refleja en experimentos realizados *in vitro*, donde la luz puede ser reemplazada por sistemas reductores artificiales, como son DTT y/o tiorredoxina.

En este sentido, hemos llevado a cabo varios intentos de reactivación de extractos crudos de Synechococcus 6301 con bajos niveles de actividad glutamina sintetasa (inactivada por oscuridad *in vivo*) empleando DTT, una mezcla de tiorredoxinas *m* y *f* de espinaca y una combinación de los dos compuestos. En ninguno de los casos se obtiene una recuperación de la actividad glutamina sintetasa (datos de inmunolectroforesis confirman la presencia de proteína glutamina sintetasa en los extractos).

Se ha intentado igualmente recuperar los niveles iniciales de actividad incubando extractos inactivos con las enzimas fosfatasa alcalina o fosfodiesterasa, en previsión de que el mecanismo de inactivación pudiera deberse a fosforilación o adenililación, como es el caso para la fotomodulación de algunos complejos antena en cloroplastos (14, 17) o para la regulación por amonio de la glutamina sintetasa de enterobacterias (143), respectivamente. En ninguno de los casos hemos obtenido con estas dos enzimas niveles de actividad superiores a los del control sin adición.

#### IV. DISCUSION

La asimilación de amonio a esqueletos carbonados se lleva a cabo en Synechococcus 6301 a través de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa. La glutamina sintetasa ha sido estudiada en profundidad en lo que a su bioquímica se refiere, tanto en esta como en otras especies de cianobacterias y otros organismos en general (154). Sin embargo, la información existente sobre la glutamato sintasa es muy escasa en cianobacterias y casi inexistente en Synechococcus 6301. La falta de estudios sobre esta enzima se debe en general a su baja concentración en los extractos celulares y a la dificultad de encontrar un método reproducible y rápido de medir su actividad, debido a la gran similitud estructural de los sustratos y productos de la reacción que lleva a cabo, y a la ausencia de métodos químicos sencillos para la detección específica de alguno de ellos.

En este trabajo, hemos completado el estudio sobre las enzimas implicadas en la asimilación de amonio a esqueletos carbonados en la cianobacteria Synechococcus 6301, caracterizando bioquímicamente la glutamato sintasa, segunda enzima de la ruta. Para ello ha sido necesario previamente poner a punto un método de ensayo rápido y sensible para la detección de actividad, tanto in situ como in vitro, que se ha aplicado igualmente al ensayo de glutamina sintetasa y de glutamato deshidrogenasa.

Igualmente, hemos profundizado en el conocimiento de la primera enzima de la ruta, la glutamina sintetasa, estudiando su regulación por condiciones de luz-oscuridad.

Seguidamente, y para una mayor claridad, discutiremos por separado los resultados obtenidos en cada uno de los aspectos del trabajo.

#### IV.A. DETERMINACION DE ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACION DEL AMONIO EN CIANOBACTERIAS, in situ E in vitro, MEDIANTE HPLC

La principal dificultad encontrada para determinar la actividad glutamato sintasa estriba, por una parte, en la inexistencia de un método práctico de seguimiento espectrofotomé-

trico, y por otra en la similitud estructural entre sustratos y productos. Por ello, para la determinación de la actividad como cantidad del producto glutamato formado se necesita previamente su separación del sustrato glutamina, ya que ambos aminoácidos reaccionan con la misma gama de compuestos susceptibles de ser utilizados para su determinación cuantitativa.

Los tres métodos empleados tradicionalmente para la separación de glutamato y glutamina de la mezcla de ensayo glutamato sintasa han sido cromatografía de intercambio iónico (126), cromatografía en papel (82) o electroforesis (92). Una vez separado, el glutamato formado se detecta habitualmente por su capacidad de formar un compuesto coloreado al reaccionar con ninhidrina (82) o radiactivamente, cuando se utilizan sustratos marcados con  $^{14}\text{C}$  (161). El método colorimétrico y la cromatografía en papel presentan el inconveniente de ser poco sensible y poco resolutivo respectivamente (169). La detección del producto radiactivo es mucho más sensible, aunque el método de ensayo sigue presentando la limitación de tiempo y resolución de la cromatografía convencional.

Algunos autores (4) han propuesto un método polarográfico basado en el seguimiento del desprendimiento de oxígeno dependiente de luz y de la presencia de sustratos para determinar la actividad glutamato sintasa en cloroplastos intactos. El procedimiento es interesante pero queda restringido a sistema intactos y, dado que es una determinación indirecta, está sometido a muchas posibles interferencias, además de lo poco práctico que resulta para ensayos rutinarios.

Martin *et al.* (99) han desarrollado un método para la determinación de actividad glutamato sintasa en extractos de raíz de *Alnus*, que emplea cromatografía líquida de alta presión en fase reversa en condiciones isocráticas para la separación de los aminoácidos, y espectrofotometría para su detección. Un sistema algo modificado de HPLC (174) ha sido también empleado por Misra y Oaks (107) para determinar actividad glutamato sintasa en extractos de endospermo de maíz.

En nuestro trabajo, hemos desarrollado un método de

ensayo de actividad glutamato sintasa basado en cromatografía líquida de alta presión y detección fluorimétrica, aplicable tanto al ensayo de enzimas presentes en extractos crudos como a determinaciones in situ en células permeabilizadas de cianobacterias. Las ventajas de este método con respecto a la cromatografía convencional quedan patentes en la figura 2, tanto en lo que se refiere a sensibilidad (3 órdenes de magnitud mayor gracias al marcaje fluorescente con OPA) como a resolución o tiempo invertido. La fluorimetría minimiza además gran número de las interferencias que pueden presentarse en la detección espectrofotométrica. Comparado con el método que emplea intercambio iónico en el cual se pueden emplear simultáneamente 10 ó 20 columnas de DOWEX, este método presenta el inconveniente de que los análisis han de realizarse de modo secuencial uno tras otro. Sin embargo, este problema se ve compensado por la posibilidad de inyección automática de las muestras, como se indica en el apartado II.D.1. La separación es completa y la respuesta lineal hasta un alto valor de concentración de aminoácidos (fig. 4). La sensibilidad del método así como su gran intervalo de utilización permiten, además, calcular un factor de corrección para contrarrestar los posibles errores en las diluciones y la derivatización. La tabla XXV resume las ventajas con respecto al método tradicional de ensayo.

El método resulta especialmente interesante para la determinación de la actividad in situ en células permeabilizadas, tanto para la glutamato sintasa como para otras enzimas implicadas en la ruta de asimilación del nitrógeno en cianobacterias, como son glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa. En el caso de la glutamina sintetasa, aparte del ensayo transferasa, rápido y sensible, se han descrito varios métodos para la determinación de su actividad biosintética (144). Algunos de ellos utilizan sistemas enzimáticos acoplados, cuya actividad permite seguir la reacción espectrofotométricamente. Otros se basan en la determinación, también espectrofotométrica, del fosfato inorgánico producido en la reacción, o en la determinación de la radiactividad aparecida en la glutamina. En

TABELA XXV

Comparación de los métodos de ensayo de actividad glutamato sintasa por cromatografía de intercambio iónico convencional y mediante HPLC

	CROMATOGRAFIA CONVENCIONAL	HPLC <sup>(1)</sup>
TIEMPO POR ANALISIS (min.)	8	3
TIEMPO REQUERIDO ENTRE ANALISIS (min.)	>30	1
VOLUMEN DE MUESTRA EMPLEADO (ml)	1	0,04
NIVEL DE SENSIBILIDAD	nmol	pmol

(1) Inyección manual.

general, los ensayos que emplean sistemas enzimáticos acoplados presentan el grave inconveniente de no ser aplicables a determinaciones in situ ya que, dada la turbidez de las muestras, la reacción no puede seguirse espectrofotométricamente, además de complicarse la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima por el solapamiento con los de las enzimas auxiliares. El ensayo con marcaje radiactivo y separación de aminoácidos utilizando resinas de intercambio iónico, muy perfeccionado (119), presenta el mismo tipo de problemas y limitaciones apuntados para la glutamato sintasa.

La enzima glutamato deshidrogenasa, otra vía posible de asimilación de amonio generalmente ausente en cianobacterias, ha sido identificada y purificada en Synechocystis 6803 (41). Su actividad dependiente de piridin-nucleótido (NADPH) es también fácil de seguir espectrofotométricamente, aunque la determinación in situ o en extractos crudos tiene los mismos inconvenientes que en el caso de la glutamina sintetasa.

El ensayo in situ de estas tres actividades en células permeabilizadas es fácilmente realizable siguiendo mediante HPLC el producto formado, aunque la eficiencia del método parece estar en función del agente permeabilizante empleado en el ensayo. En el caso de glutamato sintasa y glutamina sintetasa, se han probado dos tipos de detergentes y un solvente orgánico, con distinto resultado (tabla I). El ensayo glutamato deshidrogenasa se lleva a cabo permeabilizando con MTA. El sistema es, en general, muy repetitivo, comparable al ensayo transferasa en el caso de la glutamina sintetasa. La respuesta contradictoria de glutamina sintetasa y glutamato sintasa a dos de los agentes permeabilizantes es difícilmente explicable, a no ser por el efecto directo de estos sobre las enzimas.

Las tablas II, III y IV demuestran que en los tres casos, la formación de producto detectado de esta forma responde realmente a la actividad que se está ensayando, corroborable, en el caso de la glutamato deshidrogenasa, por la estequiometría 1 a 1 entre glutamato formado y NADPH oxidado.

La reproducibilidad de este sistema de ensayo es en general muy buena, y ha permitido llevar a cabo el estudio



bioquímico de la glutamato sintasa de Synechococcus 6301.

#### IV.B. ESTUDIOS SOBRE LA GLUTAMATO SINTASA DE Synechococcus 6301

Dos vías principales han sido propuestas para la asimilación de amonio: glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa/glutamato sintasa. Un gran número de evidencias experimentales apoyan el funcionamiento de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa en este proceso: los bajos valores de Km de las enzimas implicadas para el amonio, los niveles de actividad detectados en los extractos, experimentos fisiológicos a tiempos cortos con marcaje radiactivo, respuesta a inhibidores, etc... Todos ellos indican que, en la mayoría de los organismos y condiciones, la glutamato deshidrogenasa participa de forma minoritaria en la incorporación primaria de amonio a esqueletos carbonados.

En cianobacterias, no se ha descrito actividad glutamato deshidrogenasa en la mayoría de las especies estudiadas, o se han detectado niveles muy bajos (59, 114), y sólo en el caso de Synechocystis 6803 se ha purificado y caracterizado una enzima con actividad glutamato deshidrogenasa (41). En Synechococcus 6301, todos los intentos llevados a cabo por nuestra parte para detectar esta actividad, tanto espectrofotométricamente como mediante HPLC, han sido infructuosos.

La existencia de actividad glutamina sintetasa en cianobacterias fue puesta de manifiesto tempranamente en Anabaena cylindrica (34), y desde entonces ha sido purificada en varias especies de cianobacterias (42, 112, 134, 152). Teniendo en cuenta esto y tras los primeros trabajos de Mifflin y Lea que ponían de manifiesto en todos los organismos fotosintéticos estudiados, incluidas cianobacterias (84), la presencia de una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, se han ido acumulando datos que apoyan el funcionamiento de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa en cianobacterias. Por una parte la ausencia de glutamato deshidrogenasa y por otra los trabajos del

grupo de Wolk detectando la aparición de marcaje radiactivo en los distintos aminoácidos tras la adición de  $^{13}\text{N}$  a varias especies de cianobacterias, unicelulares y filamentosas, llevan a la conclusión de que esta es la vía principal de asimilación de amonio a esqueletos carbonados en estos organismos, a excepción de Synechococcus leopoliensis UTEX 625, estirpe en la cual esta ruta parece contribuir sólo en un 40% al total de amonio asimilado (105).

Los resultados presentados en los apartados III.B.1.1 y 2 demuestran la presencia de una actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina en células de Synechococcus 6301. La producción de glutamato detectada *in situ* es totalmente dependiente de los sustratos añadidos, no variando con la presencia del inhibidor de transaminasas AOA. Los niveles obtenidos, aproximadamente 2 U/mg clorofila, así como los niveles medios de glutamina sintetasa presentes en células crecidas con nitrato como fuente de nitrógeno (de 2,5 a 3 U/mg clorofila) apoyan el funcionamiento secuencial de estas dos enzimas en el proceso de asimilación de nitrógeno en Synechococcus 6301.

Los resultados presentados en la tabla V identifican a la glutamato sintasa de Synechococcus 6301 como una ferredoxina-glutamato sintasa, siendo la actividad detectada en ausencia de ferredoxina añadida consecuencia de la ferredoxina endógena presente en los extractos, como se demuestra por la bajada en los niveles de actividad que ocurre cuando se separan ambas proteínas en una cromatografía de intercambio iónico (fig. 6). Este parece ser igualmente el caso en heterocistos de Nostoc muscorum, donde se detecta una actividad de glutamato sintasa dependiente de NAD(P)H que los autores atribuyen a la presencia en estas células de actividad ferredoxina/NADP oxidorreductasa (55). Igualmente, se puede descartar la presencia de actividad NADPH-glutamato sintasa en los extractos de Synechococcus 6301, ya que el pico mayoritario de actividad metilviológeno-glutamato sintasa (actividad generalmente asociada a la NAD(P)H-glutamato sintasa o a la suma de esta y ferredoxina-glutamato sintasa (33, 97)) que se obtiene después de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (fig. 6) eluye al mismo valor de

concentración de NaCl que la actividad ferredoxina-glutamato sintasa (fig. 13), coincidiendo el segundo pico obtenido, minoritario, con la presencia en las fracciones de ferredoxina, que serviría de donador de electrones en el ensayo de éstas con mayor eficiencia que el metilviológeno. La actividad detectada en los extractos con NADPH como agente reductor será debida, por tanto, a la presencia en éstos de ferredoxina y ferredoxina/NADP oxidoreductasa. No se obtiene ninguna actividad cuando el NADH sustituye al NADPH.

En espinaca, Hirasawa y Tamura (65) observan que la relación entre las actividades dependientes de ferredoxina y metilviológeno es mucho mayor en preparaciones de enzima pura que en extractos, y atribuyen esta diferencia a la presencia, en preparaciones crudas, de una mayor proporción de una forma modificada de la proteína con menor afinidad por la ferredoxina (ver más adelante). Sin embargo, vistos nuestros resultados, la presencia de ferredoxina endógena en los extractos nos parece una explicación más probable para este fenómeno. El mismo tipo de controversia se planteó con la nitrato reductasa de este mismo organismo, donde algunos resultados apuntaban a la existencia de una proteína dependiente de NADH (58). Sin embargo, la eliminación de la ferredoxina de los extractos demostró la ausencia de esta actividad (26).

La detección únicamente de actividad ferredoxina-glutamato sintasa coincide con lo anteriormente descrito para cianobacterias (84, 110).

No hay datos en la bibliografía acerca de la localización intracelular de la ferredoxina-glutamato sintasa en cianobacterias. La enzima de plantas parece ser cloroplástica, y no estar asociada fuertemente a membranas. Los datos de la tabla VI muestran cómo la proteína de Synechococcus 6301 se recupera en la fracción soluble empleando cualquiera de los cuatro métodos de rotura ensayados, indicando que la glutamato sintasa no parece estar asociada a membranas en este organismo.

Poco hay hecho, igualmente, sobre la regulación de glutamato sintasa por la fuente de nitrógeno en organismos fotosintéticos. Los datos en zanahoria señalan que los niveles de

NADPH-glutamato sintasa no varían con la fuente de nitrógeno empleada para el crecimiento (36), mientras que en Lemna la actividad presente en amonio es el 73% de la detectada en nitrato (126). En Chlamydomonas reinhardtii, se observa un aumento de la actividad NADH-glutamato sintasa al pasar células creciendo en amonio a un medio carente de fuente nitrogenada (97). La ferredoxina-glutamato sintasa varía poco sus niveles en estas condiciones. En Synechococcus 6301, observamos un ligero aumento de la actividad glutamato sintasa cuando células creciendo en nitrato se pasan a medios conteniendo amonio como única fuente de nitrógeno (tabla VII). No parece, pues, que la ferredoxina-glutamato sintasa esté sometida a un fuerte control por fuente de nitrógeno en este organismo, como es el caso de la glutamina sintetasa.

La determinación in situ de los parámetros cinéticos de la ferredoxina-glutamato sintasa (pH y temperatura óptimos, constantes de afinidad, cinética de aparición de producto) es necesaria para la puesta a punto de las condiciones del ensayo. Tras los resultados obtenidos (figs. 7, 8 y 9), elegimos pH 7,5, 30°C y 15 minutos de incubación como valores estándar para el ensayo de la actividad.

Es interesante comparar los valores de constantes de afinidad de la enzima por sus sustratos obtenidos in situ en células permeabilizadas (figs. 10 y 12) con los determinados in vitro para la enzima purificada (tabla XVIII). Las concentraciones necesarias para saturar la actividad en el caso de la glutamina son bastante superiores en las determinaciones in situ. Esto parece indicar cierta dificultad de los sustratos para acceder a la enzima, a pesar de la permeabilización, o un resellamiento de las membranas en vesículas tras la permeabilización, dificultando el paso de los sustratos. Este es un dato a tener en cuenta a la hora de evaluar, en general, los resultados obtenidos en determinaciones in situ de actividades en células permeabilizadas.

La alta afinidad de la glutamato sintasa por el metilviológeno en ensayos in situ, sólo aparente ya que la enzima es apenas activa con este donador de electrones in vitro, es

otra muestra de las precauciones a tomar cuando se trabaja en células enteras, ya que son múltiples las interferencias posibles ( en este caso, con la ferredoxina endógena presente en las células).

Como se ha discutido anteriormente, parece que al menos una enzima con actividad glutamato sintasa está presente en todos los casos en organismos capaces de asimilar amonio. En bacterias, la actividad es dependiente de piridín-nucleótidos mientras que en plantas superiores y algas verdes se han descrito dos enzimas, una dependiente de piridín-nucleótido y otra de ferredoxina, habiéndose purificado y caracterizado en mayor o menor extensión las enzimas procedentes de estas fuentes (154). En cianobacterias, se ha detectado actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina. Sin embargo, salvo esta información, nada se sabe acerca de las características de la enzima procedente de estos organismos (53, 85). Era por tanto necesario llevar a cabo una caracterización de la proteína una vez conseguida su purificación a homogeneidad. Se ha elegido para ello la cianobacteria Synechococcus 6301 por ser abundante, en este organismo, la información existente sobre la otra enzima de la ruta, la glutamina sintetasa, tanto a nivel bioquímico (purificación y caracterización) como a nivel fisiológico (regulación por distintos efectores ambientales). Hay que destacar que hasta la fecha sólo se han purificado hasta homogeneidad las ferredoxina-glutamato sintasas de organismos eucariotas fotosintéticos, por lo que la purificación y caracterización expuestos en este trabajo son las primeras que se describen en un organismo procariota fotosintético.

Las purificaciones de ferredoxina-glutamato sintasa llevadas a cabo hasta ahora en eucariotas fotosintéticos se caracterizan, salvo en el caso del maíz donde se obtiene una recuperación del 40% (102), por su bajo rendimiento (entre 5 y 25%) y consiguen un grado de purificación de 100 a 200 veces. Estos bajos rendimientos se discuten en términos de pérdida de grupos prostéticos e inactivaciones en los primeros pasos de la purificación. La estabilidad de la enzima parece mejorar en general

cuando el tampón se suplementa con inhibidores de proteasas, con protectores de grupos sulfhidrilos ( $\beta$ -mercaptoetanol o DTE) y con el sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato (102). Algunos autores observan además que la adición de NaCl contribuye igualmente a estabilizar a la enzima (65).

Estos datos, así como nuestros propios resultados (tabla VIII), nos han llevado a elegir el tampón A a lo largo de la purificación, en el cual la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y  $\alpha$ -cetoglutarato parece ser fundamental para aumentar la estabilidad de la enzima en solución.

Una vez obtenidos los extractos, la purificación se inicia con una precipitación fraccionada con etanol en presencia de alta fuerza iónica. Este paso había sido utilizado ya con buen rendimiento para la purificación de la nitrato reductasa de este mismo organismo (26) y resultó ser un buen sistema para ser empleado como primer paso en nuestra purificación, dado su elevado rendimiento (la enzima es bastante estable en 70% de etanol) y el factor de purificación obtenido (35 veces). Sin embargo, este paso ha de realizarse con precauciones, ya que variaciones en la concentración inicial de proteína pueden alterar el rendimiento final. Otros autores (65, 159) emplean para la glutamato sintasa de espinacas un paso semejante de fraccionamiento, con acetona entre 35 y 75%, con un rendimiento cercano o igual al 100%.

La alta fuerza iónica presente durante el fraccionamiento se obtiene en nuestro caso por adición de NaCl hasta un valor de 0,8 M, en sustitución del  $\text{NaNO}_3$  que se emplea en la purificación de la nitrato reductasa (26). El nitrato, por ser un compuesto altamente caotrópico, es un agente capaz de extraer proteínas asociadas a membranas en Synechococcus 6301, entre ellas la nitrato reductasa, que interfiere en los pasos posteriores de la purificación de la glutamato sintasa, dado que ambas enzimas son dependientes de ferredoxina. La figura 39 representa la filtración en gel mediante HPLC de la fracción pico resultante de la cromatografía de afinidad de una purificación en la que el extracto de partida se trató con nitrato en vez de cloruro. En esta cromatografía se aprecian además de la

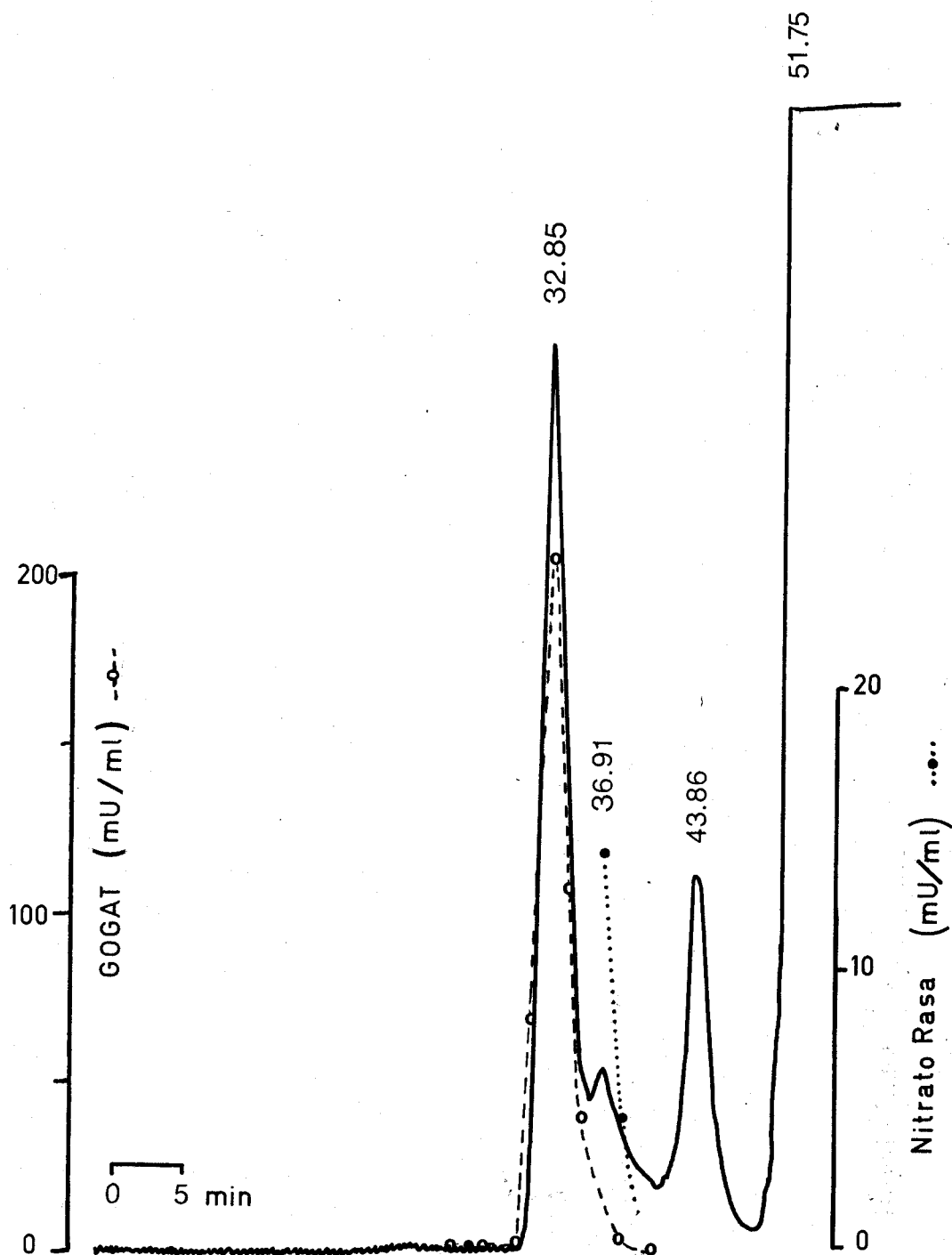


Figura 39: Cromatografía de filtración en gel del eluato de una cromatografía de afinidad en ferredoxina sefarosa cuando la purificación se inicia con un fraccionamiento por etanol en presencia de 1 M de  $\text{NaNO}_3$ .

La cromatografía se lleva a cabo como se indica en el apartado II.E.3.3. Se recogen fracciones de 0,5 ml de las que se ensayan las actividades glutamato sintasa y/o nitrato reductasa según se indica en los apartados II.C.1.2 y II.C.4.5 respectivamente. Volumen de muestra inyectada: 250  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. El pico a los 51.75 minutos corresponde a los componentes del tampón. Trazo continuo: absorbancia a 280 nm.

glutamato sintasa otros dos picos de proteína, uno correspondiente a la nitrato reductasa (identificada por su actividad) y el otro a la ferredoxina (identificada en filtraciones paralelas por su absorbancia a 420 nm). El tiempo de retención de ambos picos coincide además con el correspondiente a su valor de peso molecular. La presencia de ferredoxina es posiblemente debida a un lavado insuficiente de la columna de afinidad una vez montada, o a la unión deficiente de una parte de la ferredoxina adsorbida a la matriz de sefarosa. Compárese con la figura 17, que corresponde a una purificación en la que el fraccionamiento con etanol se llevó a cabo en presencia de cloruro sódico.

Seguidamente se lleva a cabo un paso de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Esta cromatografía ha sido empleada hasta ahora en todas las purificaciones de ferredoxina glutamato sintasa llevadas a cabo en algas y plantas superiores, con buenos resultados. En nuestro caso, el rendimiento es bueno y el proceso resulta muy repetitivo. Permite, además, eliminar la ferredoxina presente en los extractos, que podría competir ventajosamente con la unida a la sefarosa en la cromatografía de afinidad posterior.

El gel de ferredoxina-sefarosa empleado en la cromatografía de afinidad es un adsorbente idóneo y muy efectivo para la purificación de enzimas dependientes de ferredoxina en general (26, 71, 95, 170) y en concreto lo ha sido para la ferredoxina-glutamato sintasa de distinta procedencia (47, 65, 102, 157, 167).

En nuestro proceso de purificación, la cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa ha resultado un paso determinante, obteniéndose un alto grado de purificación (unas 30 veces), aunque con un rendimiento medio inferior (50%) al obtenido por otros autores (102, 157, 167). Esta cromatografía presenta el mencionado inconveniente de no ser muy repetitiva, ya que la afinidad de las columnas por la glutamato sintasa disminuye después de su uso prolongado en tampón A. Desde el punto de vista de mantenimiento de los geles, nos parece más conveniente trabajar con varias columnas de pequeño tamaño y repetir la cromatografía cuando es necesario, a trabajar con columnas de mayor



longitud, ya que en este caso un mayor volumen de gel perdería simultáneamente su capacidad de unir a la glutamato sintasa.

La afinidad de la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301 por el gel de ferredoxina-sefarosa es inferior a la que presenta la enzima procedente de hojas de maíz (102), ya que se eluye enteramente con sólo aplicar 0,15 M de NaCl. El valor mínimo de NaCl necesario para eluir a la enzima será pues del orden del empleado con la proteína de Chlamydomonas (97) y plantas superiores (157, 167), aproximadamente 0,1 M.

El resultado final de la purificación es una preparación enzimática homogénea a juzgar por los datos de electroforesis, en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes, y por la cromatografía de filtración en gel, con una actividad específica de 30 U/mg de proteína, inferior sólo a la obtenida con la enzima de espinaca (65) y del orden de la obtenida en arroz (157).

En todas las purificaciones realizadas, se observan siempre dos bandas de proteína que migran a distinta velocidad en electroforesis no desnaturizante. Ambas presentan actividad glutamato sintasa, determinada tanto colorimétricamente en el gel entero como con ensayos estándar de varias rodajas cortadas del gel. Dos bandas aparecen, igualmente, en electroforesis en presencia de SDS, con una diferencia en sus pesos moleculares de un 3%. En ambos casos, la intensidad de la banda de la proteína de menor tamaño varía de unas purificaciones a otras, siendo a veces muy minoritaria. Todos estos datos parecen indicar que una de las bandas (la que migra a menor velocidad en condiciones no desnaturizantes y a mayor en presencia de SDS) es una forma degradada de la proteína original, que conserva cierta actividad enzimática. La alta sensibilidad a proteasas, probablemente a causa del elevado peso molecular de la enzima, parece una característica común a las glutamato sintasas de organismos fotosintéticos (65, 102). Por otra parte, en espinaca, Hirasawa y Tamura (65) han detectado dos formas de ferredoxina-glutamato sintasa que aparecen cuando las cromatografías se llevan a cabo en ausencia de  $\alpha$ -cetoglutarato, a las que denominan enzima

nativa y enzima modificada. Estas dos formas de la enzima presentan diferencias en sus pesos moleculares, actividad específica y comportamiento en cromatografía de afinidad, que los autores atribuyen a un cambio estructural irreversible (desnaturalización parcial) de la proteína. La enzima de Synechococcus 6301 es muy semejante en sus características generales a la de espinacas. Sin embargo, no parece que las dos bandas obtenidas en nuestro caso en electroforesis tengan relación con las dos proteínas descritas en espinaca, ya que la diferencia en peso molecular que observamos es muy inferior. Los autores no describen el comportamiento electroforético de las dos formas.

La ferredoxina-glutamato sintasa purificada de Synechococcus 6301 está formada por una única cadena polipeptídica de gran tamaño, con un coeficiente de sedimentación de 8,46 S y radio de Stokes de 4,32 nm. El coeficiente relativo de fricción calculado ( $f/f_0$ ), igual a 1,213, sugiere una forma ligeramente alargada.

El peso molecular de la enzima ha sido estimado por varios métodos: mediante cromatografía de filtración en gel, electroforesis en presencia de SDS y aplicando la fórmula de Siegel y Monty (146) que emplea los valores de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación previamente calculados. En el primer caso se obtiene un valor de 138 kDa, inferior al deducido de los otros métodos, 156 kDa. La filtración en gel parece pues subestimar el peso molecular de esta proteína, fenómeno que ocurre también en la nitrato reductasa de la misma procedencia, y en la glutamato sintasa de Chlamydomonas (47) y espinaca (65). Esto podría ser debido a interacciones de la proteína con la matriz de sefarosa.

La proteína consta de una sola subunidad, cuyo alto valor de peso molecular, poco frecuente en proteínas de un solo péptido, corresponde con el determinado para otras glutamato sintasas y está de acuerdo con el tamaño del ARN mensajero aislado de maíz, de aproximadamente 4.000 nucleótidos (con poli-A), cuyo producto de síntesis protéica in vitro reacciona con antisuero anti-glutamato sintasa de arroz (29).

Las características espectroscópicas observadas en la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301 ponen de manifiesto la presencia de un grupo prostético flavínico en la preparación enzimática. La presencia de flavinas ha sido descrita también en la enzima dependiente de ferredoxina tanto de C. reinhardtii (97) como de espinaca (65) y en todas la glutamato sintasas dependientes de NAD(P)H descritas.

El hecho de que la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato, sustrato fisiológico, permita a la enzima, previamente reducida con ditionito, recuperar el espectro típico de flavoproteína oxidada indica que el grupo prostético flavínico es funcional durante la catálisis.

El análisis del grupo prostético extraído de la proteína con varios métodos da como resultado una única molécula de FMN presente por molécula de proteína. La relación de absorbancias a 280 y 438 nm (máximos de absorción de proteína y flavina respectivamente) tiene un valor de 11, bastante superior al obtenido en la enzima de C. reinhardtii, con dos restos flavínicos, en la que la relación es de 7. El coeficiente de extinción mM a 438 nm es de  $17,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , superior al esperado para una enzima con un único componente flavínico ( $E_{\text{cm}}^{\text{mM}}(\text{FMN}) = 12,3$ ). En general se observa que aquellas flavoproteínas que no tienen ningún componente metálico presentan en el máximo de absorción de flavinas (ca. 450 nm) una densidad óptica exactamente igual a la esperada según el contenido flavínico de la enzima (123). Sin embargo, esto no es así para flavoproteínas que contienen uno o más átomos de hierro no hemínico. Por ejemplo, en la dihidroorotato deshidrogenasa de Zymobacterium oroticum, flavoproteína con 2 átomos de hierro no hemínico y 2 grupos flavínicos (46), se observa que el valor de absorbancia correspondiente al pico de flavina (450 nm) es mayor de lo esperado por su contenido en este cofactor. Los autores atribuyen este hecho a la presencia de hierro no hemínico en la molécula, siendo el  $E_{\text{cm}}^{\text{mM}}_{450} = 11$  para la ferroproteína desprovista de flavina. En general, en ferro-flavoproteínas, cada átomo de hierro contribuye con un  $E_{\text{cm}}^{\text{mM}}_{450} = 5$  al espectro de la proteína nativa (123).

Este podría ser el caso para la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301, en la cual el coeficiente de extinción molar de la proteína a 438 nm se vería aumentado por la presencia de un átomo de hierro que contribuiría a la absorbancia en algunas zonas del espectro (hombros a 418 y 476 nm, característicos de ferroproteínas, y cierta absorbancia a 550 nm, donde no absorben las flavinas). Sin embargo, las altas concentraciones necesarias para que la ferrocina, reactivo específico de metales divalentes como el hierro (156), inhiba apreciablemente el ensayo de la glutamato sintasa aboga en contra de esta idea. El efecto nulo que causa la incubación con agentes quelantes de metales apuntan en el mismo sentido. Sin embargo, estos reactivos tampoco son capaces de inactivar de forma importante las glutamato sintasas de espinaca y maíz, que sí contienen átomos de hierro como parte de su molécula (65, 102).

Hasta ahora, en todas las glutamato sintasas en las que se han detectado grupos prostéticos flavínicos, se han medido 2 moléculas de flavina (FMN, FAD o ambas) por molécula de enzima. La proteína de Synechococcus 6301 es por tanto distinta a todas las demás en este aspecto.

La ferredoxina glutamato sintasa purificada de Synechococcus 6301 es altamente específica para sus sustratos glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato como donador y aceptor, respectivamente, del grupo amino. Es igualmente muy específica para la ferredoxina, no pudiendo utilizar ningún otro donador fisiológico de electrones. Su actividad con el donador artificial metilviológico es muy baja, coincidiendo con lo descrito para la ferredoxina-glutamato sintasa de C. reinhardtii (33, 97).

Parece pues que el centro activo de la enzima es muy específico, como se confirma estudiando el posible efecto inhibitorio de algunos análogos de la glutamina. Tanto azaserina como DON, inhibidores irreversibles clásicos de glutamina--amidotransferasas (25, 118) son potentes inhibidores de la ferredoxina-glutamato sintasa (tabla XX), siendo el DON mucho más efectivo (100% de inhibición a 0,1 mM). Albiziina y N-acetil-glu-

tamina, dos análogos de glutamina, causan cierta inhibición, aunque a una concentración muy elevada. Reactivos como la semicarbazida o hidroxilamina, inhibidores de transaminasas (en general de enzimas en las que interviene el piridoxal fosfato) inhiben a la enzima a concentraciones muy altas. La actividad no se afecta sin embargo por la presencia de aminooxiacetato, inhibidor también de transaminasas. El MSX, inhibidor clásico de glutamina sintetasa no tiene efecto alguno.

Estos resultados, salvo en lo que respecta a efecto de hidroxilamina y semicarbazida, son comparables a los obtenidos con otras ferredoxina-glutamato sintasas.

La incubación de la proteína con reactivos quelantes de metales no tiene apenas efecto sobre la actividad, dato que está en contradicción con la posible presencia de hierro en la proteína.

De los reactivos de grupos sulfhidrilos empleados, únicamente el pHMB inactiva de forma significativa a la enzima, aunque en un grado muy inferior al descrito para otras glutamato sintasas. Este resultado cuestiona la esencialidad de los grupos tiólicos para la acción catalítica de la enzima.

Es interesante destacar la inactivación parcial que se obtiene cuando la enzima se incuba con fosfato de piridoxal, agente modificador reversible de lisinas (38). El efecto obtenido podría apuntar a la presencia de este aminoácido en el centro activo de la proteína. La ciclohexanodiona, modificador de argininas, no tiene efecto alguno.

La tabla XXVI compara las propiedades moleculares y cinéticas de las ferredoxina-glutamato sintasas purificadas de distinta fuente. Los pesos moleculares oscilan entre 141 y 224 kDa, y, salvo la proteína de arroz, todas están compuestas de una única subunidad. Como principal diferencia, hay que destacar la presencia de un solo grupo flavínico (FMN) en la proteína de Synechococcus 6301, en contraposición a los dos grupos detectados en Chlamydomonas y espinaca. Los espectros de absorción son muy semejantes entre estos tres organismos.

TABLA XXVI

Propiedades de algunas ferredoxina-glutamato sintasas purificadas de distintas fuentes

FUENTE	<u>Synechococcus</u> 6301 este trabajo	<u>Chlamydomonas</u> (97)	<u>Zea mays</u> (102)	<u>S. oleracea</u> (65)	<u>Vicia faba</u> (167)	<u>Oryza sativa</u> (157)	<u>L. esculentum</u> (10)
Peso molecular (kDa)	156	146	160	170	145	224	141
Subunidades	1	1	n.d.	1	n.d.	2 x 115	1
Radio Stokes (nm)	4,35	4,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Coefic. Sediment. (S)	8,46	8,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Coefic. fricción	1,213	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	7,8
Temperatura óptima °C	42	35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Km Ferredoxina (µM)	7,1	15	1,7	1	2	5,5	0,2
Km -cetoglutarato (mM)	1,7	1	0,24	0,089	0,15	0,33	0,2
Km Glutamina (mM)	0,7	0,7	1,1	0,556	0,33	0,27-0,57	0,55
<u>GRUPOS PROSTETICOS</u>							
Flavinas	1 FMN	1FAD:1FMN	-	1FAD:1FMN	-	-	n.d.
Agrupaciones sulfoféricas	n.d.	3Fe-4S	-	4Fe-4S	-	-	-
Máximos de absorción	279; 370; 438	278; 377; 437	-	279; 360; 438	-	-	-
A <sub>279</sub> /A <sub>438</sub>	11	7-7,5	-	5	-	-	-
Actividad especif. (U/mg prot)	30	6,5	14,1	105	7	35,9	1,35

#### IV.C. REGULACION POR LUZ-OSCURIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE Synechococcus 6301

En la actualidad, está ampliamente aceptado que la modulación por luz-oscuridad de actividades enzimáticas en organismos fotosintéticos es un proceso regulatorio importante que dirige el metabolismo hacia la síntesis y almacenamiento de productos en la luz y hacia su degradación en la oscuridad (5). La fotomodulación asegura, por tanto, que no ocurran en la oscuridad procesos innecesarios y de alto coste energético, evitando el consiguiente despilfarro de las reservas metabólicas.

La función de la enzima glutamina sintetasa es básicamente de asimilación primaria de nitrógeno a esqueletos carbonados, en un primer paso en la ruta de síntesis de aminoácidos y de otros compuestos nitrogenados. La reacción que lleva a cabo implica la utilización de compuestos ricos en energía (ATP), constituyendo un paso irreversible en la vía de incorporación de amonio. En general, hay que destacar que en organismos fotosintéticos, un alto porcentaje de toda la energía luminosa captada se emplea en el proceso de reducción y asimilación de nitrógeno.

Synechococcus 6301 es un organismo fotoautótrofo estricto cuyo metabolismo en la oscuridad se ve reducido a una respiración endógena encaminada a mantener los niveles intracelulares mínimos de ATP, utilizados a una tasa muy inferior a la de condiciones de luz saturante. En la oscuridad, la célula emplea sus reservas energéticas no en aumentar sus polímeros de crecimiento (proteínas, ácidos nucleicos, etc...) sino principalmente en mantener un nivel basal de actividades metabólicas que le permitan sobrevivir durante un largo periodo y ser capaz de reiniciar un metabolismo activo cuando se restablezcan las condiciones de iluminación (148). Estas actividades deben incluir, principalmente, regulación del pH interno, retención de metabolitos de bajo peso molecular y resíntesis de macromoléculas inestables, además de otras funciones no imprescindibles para la supervivencia (35). Es por lo tanto necesario que la síntesis de proteínas, y por consiguiente de aminoácidos, se vea frenada en estas condiciones. Por ello es de esperar que la

glutamina sintetasa, enzima encargada del primer paso irreversible de la ruta, esté sometida a una estricta regulación por condiciones de iluminación, como ocurre con otras enzimas clave responsables del metabolismo del carbono; su inactivación en la oscuridad sería, pues, una manera de disminuir los niveles anabólicos del organismo.

La regulación por luz en cianobacterias ha sido observada para las enzimas ribulosa-5-P quinasa, glucosa-6-P deshidrogenasa (37), isocitrato deshidrogenasa, nitrito reductasa (163) y glutamina sintetasa (132). En este último caso, los estudios in vivo se han limitado a describir en células de Synechococcus 6301 y Anabaena cylindrica transferidas a oscuridad una pérdida de actividad a largo plazo menor del 50%, reversible al volver a condiciones de luz saturante (los experimentos se llevan a cabo en el transcurso de varias horas).

Como describimos en el apartado III.C.1.1, la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 sufre una bajada drástica de actividad cuando las células se transfieren de condiciones de luz saturante a oscuridad absoluta. La caída es rápida ( $t_{1/2} = 60$  minutos) y se pueden alcanzar niveles de hasta un 5% de la actividad inicial transferasa, ó un 20% de la biosintética. Del mismo modo, cuando las células se vuelven a transferir a la luz, se recupera en poco tiempo el 100% del nivel inicial presente antes de someter las células a la oscuridad. El tiempo medio del proceso es, en este caso, menor de 10 minutos, dependiendo de la intensidad de reiluminación. Todo este proceso es un fenómeno de inactivación reversible que no implica, en los tiempos estudiados (0-5 horas), una degradación enzimática (transición luz a oscuridad) o síntesis de novo (transición oscuridad a luz). Así lo demuestran la alta velocidad de reactivación al reiluminar y la insensibilidad de ésta a inhibidores de síntesis proteica, los resultados obtenidos con antisuero anti-GS, y la reactivación, a veces total, que sufre la enzima durante la preparación de extractos a partir de células con bajos niveles de glutamina sintetasa. Esto resulta por otra parte lógico si se tiene en cuenta el elevado peso molecular de la glutamina sintetasa. Un mecanismo de regulación que implicase degradación y síntesis de



una proteína de 600 kDa supondría un elevado coste para la célula, además de disminuir mucho las velocidades de respuesta a variaciones en las condiciones ambientales.

Los niveles finales de actividad determinada in situ que obtenemos tras varias horas en la oscuridad en nuestros experimentos son muy inferiores a los descritos por otros autores para este mismo organismo (132, 163). Esto puede ser debido a que los ensayos se llevan a cabo en esos casos en extractos crudos tras el consiguiente tratamiento de rotura para su obtención. Hemos observado que en Synechococcus 6301 la preparación de extractos conlleva una recuperación, al menos parcial, de la actividad con respecto a la determinada in situ en células permeabilizadas. Esta podría ser la causa de que las inactivaciones observadas por otros autores no superen un 50%. Otra posible explicación a este hecho podría ser la fase de crecimiento del cultivo en el momento de iniciar el experimento. Como se demuestra en la figura 30, este es un punto crucial para obtener los máximos niveles de inactivación.

Por otra parte, la bajada en los niveles de actividad se debe a una inactivación y no a una inhibición por acumulación de productos en el interior celular, ya que es de esperar que estos se diluyan en la mezcla de ensayo al permeabilizar las células. Hay que resaltar, además, que la glutamina sintetasa es una enzima presente a altas concentraciones en la célula, llegando a constituir hasta el 1% de la proteína total (42). Es lógico pensar que la regulación de una enzima tan abundante no se lleve a cabo de forma alostérica, mediante un mecanismo, por ejemplo, de retroinhibición, ya que esto requeriría que una alta proporción del producto formado en la reacción se emplease para la propia regulación de la enzima. Parece ser un fenómeno repetido en la naturaleza que proteínas muy abundantes en la célula no se regulen directamente de forma alostérica por los propios productos de su reacción o por otros metabolitos intracelulares, sino que éstos actúan sobre otras enzimas intermediarias que llevan a cabo una amplificación enzimática de la señal reguladora.

El proceso de inactivación parece depender del estado metabólico de la célula, siendo nulo en las primeras fases de crecimiento y máximo en medio de la fase lineal. Esto da a entender que las células necesitan unas condiciones internas determinadas para ser capaces de desencadenar el mecanismo de fotomodulación de la glutamina sintetasa, ya sea por los niveles intracelulares de compuestos presentes, ya por la diferencia en la organización y concentración de pigmentos en las membranas de acuerdo con la limitación de luz en cada una de las situaciones (asumimos que la pérdida de exponencialidad del crecimiento no es por limitación de nutrientes en el medio sino por un efecto de sombreado como consecuencia del aumento de la densidad del cultivo). En este sentido, se ha descrito en células de Synechococcus 6301 que el contenido en clorofila varía con la intensidad de la luz incidente en el cultivo (166) y también que la conformación de las membranas fotosintéticas varía en las transiciones luz-oscuridad, dependiendo además del estado metabólico de las células (57).

Por lo que sabemos, sólo se ha descrito un efecto semejante de la edad del cultivo en estudios sobre la regulación por amonio y por luz de la ferroproteína de la nitrogenasa de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum (121). Esta enzima se inactiva de forma covalente cuando los niveles intracelulares de glutamina alcanzan un valor alto, como es el caso cuando se añade amonio, y el grado de inactivación depende en cada caso de la edad del cultivo. Se observa una clara correlación entre este último efecto y la disminución en los niveles intracelulares de glutamato detectados en células de mayor edad, que impiden que se alcancen valores de glutamina lo suficientemente altos como para desencadenar el mecanismo. Esta misma enzima se inactiva igualmente por oscuridad, observándose de nuevo un efecto similar de la edad del cultivo. Sin embargo en este caso no se detecta variación alguna, previa a la inactivación, en los niveles de glutamato y glutamina. Resulta por lo tanto difícil de explicar el efecto que el envejecimiento del cultivo tiene sobre el mecanismo de inactivación, que no parece depender de los niveles de aminoácidos, al menos de forma exclusiva.

Con los datos disponibles actualmente en Synechococcus 6301, nos resulta imposible explicar este comportamiento de las células en las distintas fases de crecimiento del cultivo.

La inactivación de la glutamina sintetasa por oscuridad se previene totalmente por la presencia en el medio de cultivo de inhibidores de síntesis de proteína, tanto a nivel de transcripción como de traducción. La caída se puede igualmente interrumpir (con unos minutos de retardo) si esos mismos inhibidores se añaden una vez iniciado el proceso de inactivación. La interpretación inmediata de este resultado es que el mecanismo de inactivación implica la síntesis de novo de algún péptido que intervendría de forma más o menos directa en el proceso. Sin embargo, el efecto casi inmediato que tienen esos inhibidores una vez iniciada la inactivación indica que, o bien el efecto no es directamente sobre la síntesis de proteína, o bien la proteína sintetizada, de tipo enzimático, está sometida a un recambio muy rápido, siendo necesaria su síntesis continua para que prosiga la inactivación de la glutamina sintetasa. Otra posibilidad compatible con estos datos es que el factor protéico sintetizado de novo sea una proteína no enzimática, es decir, una proteína cuyo efecto inactivador no se deba a una reacción en la que la glutamina sintetasa actúe como sustrato "renovable", sino a una modificación "estructural" que implique la participación constante de la proteína inactivadora. La inactivación se produciría por unión directa a la enzima de la proteína sintetizada de novo. Esto podría explicar la necesidad de una síntesis continua de proteína para inactivar a toda la glutamina sintetasa presente, e igualmente justificaría la rápida reactivación que tiene lugar en la obtención de extractos. Sin embargo, cuando las células se someten a varios ciclos cortos de luz-oscuridad (fig. 36), la adición de cloranfenicol sigue impidiendo la inactivación de la glutamina sintetasa en un segundo paso a oscuridad tras 20 minutos de reiluminación. Si la inactivación se debiera a la unión de una proteína, ésta se sintetizaría durante la primera transición a oscuridad y es de esperar que estuviera aún presente en las células al repetirse por segunda vez el proceso,

pudiéndose unir de nuevo a la enzima activa independientemente de la presencia de cloranfenicol. Este resultado contradice que la inactivación se deba a un mecanismo de unión directa de una proteína sintetizada de novo, a menos que esté sometida a un recambio rápido.

El efecto de cloranfenicol y rifampicina podría ser indirecto, si el factor desencadenante de la inactivación fuese un desbalanceo en las proporciones intracelulares de algunos compuestos por un bloqueo en el metabolismo basal. Asumiendo que intervengan compuestos nitrogenados, la adición de inhibidores de síntesis de proteína alteraría de alguna forma esas proporciones, evitando que se iniciase la respuesta.

La última posibilidad, efecto directo de los inhibidores sobre la enzima, puede descartarse, ya que es poco probable que compuestos con estructuras tan distintas como cloranfenicol y rifampicina sean capaces de interaccionar ambos directamente con la proteína y de forma similar.

El único caso de inactivación de enzimas implicadas en asimilación de nitrógeno por oscuridad para el que se ha descrito una dependencia de síntesis proteica es la nitrato reductasa de Hordeum vulgare L. (164), para la que los autores concluyen que el control del nivel de actividad en la planta se debe a un balanceo entre sistemas activantes e inactivantes, siendo estos últimos sintetizados de novo al pasar la planta a oscuridad. Esta interpretación es compatible con sus resultados, ya que sus tiempos medios de inactivación son de varias horas. Este fenómeno no parece tener por tanto ninguna relación con nuestros resultados en Synechococcus 6301.

Mediante la adición de inhibidores de fotosíntesis, hemos intentado reproducir separadamente algunas de las situaciones fisiológicas esperables al pasar las células a oscuridad. Tanto el DCMU como el sistema benzoquinona/ferricianuro (165), capaces ambos de interrumpir el flujo de electrones entre los fotosistemas II y I, provocan un efecto comparable al de la oscuridad sobre la glutamina sintetasa de células creciendo a la luz. Este efecto puede ser debido o al corte en el flujo de

electrones en sí (ausencia de poder reductor) o una previsible bajada en los niveles de ATP por imposibilidad de fotofosforilación no cíclica. La adición de DCCD, inhibidor de ATPasas, no produce por sí sola variación en los niveles de actividad glutamina sintetasa, como tampoco la produce el CCCP, factor desacoplante que impide la síntesis de ATP al disipar el gradiente electroquímico de protones. Todo ello parece indicar que el efecto de la oscuridad es debido a la interrupción del flujo de electrones entre los dos fotosistemas, probablemente porque ello conlleva la detención de la síntesis de poder reductor, siendo el proceso independiente del estado energético (niveles de ATP) de la célula.

Las enzimas reguladas por luz lo son habitualmente mediante mecanismos de tipo redox mediados por proteínas que implican finalmente reducción de puentes disulfuro en la proteína bajo control. En plantas superiores, estas reacciones son generalmente sensibles a inhibidores del flujo de electrones y pueden reproducirse *in vitro* en la oscuridad por agentes reductores artificiales (73). La reactivación de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* 6301 por luz se impide totalmente por la presencia del inhibidor DCMU (fig. 37), que en estas condiciones debe permitir el funcionamiento de la fotofosforilación cíclica (ca 50% de los niveles totales de síntesis de ATP) (20). Por su parte, el CCCP no afecta al proceso de reactivación y el DCCD al principio tampoco, aunque impide finalmente que se recupere el 100% de la actividad presente inicialmente. Estos datos apuntan de nuevo a que el factor desencadenante del proceso de reactivación sea un mecanismo exclusivamente de reducción. Las dos propuestas actuales con mayor apoyo experimental que intentan explicar los mecanismos de regulación redox mediados por proteínas en plantas superiores son el sistema ferredoxina/tiorredoxina (24) y el sistema LEM (light effect mediator) (5). Según el primero, la recuperación del flujo no cíclico de electrones al ser iluminadas las células reduciría la ferredoxina presente, que serviría a su vez de donador para la reducción de la tiorredoxina mediada por la ferredoxina-tiorredoxina oxidoreductasa. En el sistema LEM intervienen proteínas de bajo potencial unidas

a membrana y un factor proteico soluble (proteina modulasa). El resultado final en ambos casos es la rotura de puentes disulfuro en la enzima inactiva sometida a regulaci3n, que pasa a ser activa.

En varias especies de cianobacterias, se ha descrito la modulaci3n in vitro de algunas enzimas por un sistema ferredoxina/tiorredoxina, como en sulfotransferasas dependientes de APS y PAPS (137), fructosa-1,6-bisfosfatasa (136), nitrito reductasa y glutamina sintetasa (163) y glucosa-6-P deshidrogenasa (31, 32).

Por otra parte, se han detectado dos tipos de proteinas cuyas propiedades las definen como tiorredoxinas en Nostoc muscorum (178), Synechococcus 6301 (135) y Anabaena sp. (49) y la presencia de mol3culas con estas caracteristicas ha sido descrita en todas las especies estudiadas (138). Igualmente, se ha detectado la presencia de ferredoxina-tiorredoxina oxidorreductasa en, al menos, una especie de cianobacteria (178). Las tiorredoxinas de cianobacteria son en algunos casos intercambiables con las de plantas superiores en la activaci3n de varias enzimas de espinaca. A su vez, las tiorredoxinas de espinaca pueden ser funcionales con enzimas de cianobacterias (163).

Nuestros intentos de reactivaci3n de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301, inactivada in vivo por oscuridad, empleando una mezcla de tiorredoxinas f y m de espinaca y DTE en las condiciones habitualmente empleadas por otros autores ha dado resultados negativos. Pensamos que una posible explicaci3n puede ser que tiorredoxina y glutamina sintetasa al proceder de organismos distintos presenten poca afinidad entre s3. Sin embargo, esto contradice los resultados de Tischner y Schmidt (163) en este mismo organismo, ya que estos autores consiguen duplicar la actividad glutamina sintetasa por incubaci3n con DTT y tiorredoxina de espinaca. En este sentido hay que hacer notar que la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 se inactiva por incubaci3n con el reactivo de grupos sulfhidrilo pHMB, siendo el efecto reversible por DTT (42). Esto parece indicar la presencia en la mol3cula de glutamina sintetasa de grupos sulfhidrilo accesibles.

Nuestros resultados no nos permiten descartar completamente el funcionamiento de un sistema ferredoxina/tiorredoxina. Para ello sería necesario efectuar incubaciones empleando tiorredoxina procedente de Synechococcus 6301 en distintas condiciones, como serían la presencia o no de sustratos u otros posibles efectores, ya que en algunas enzimas de plantas parecen intervenir también en el sistema de regulación (64).

La forma más frecuente de regulación de la glutamina sintetasa en microorganismos (enterobacterias, bacterias fotosintéticas, etc...) es el conocido mecanismo de adenililación (143). Todas las evidencias experimentales en cianobacterias están, sin embargo, en contra de su funcionamiento en estos organismos (40, 111). En Synechococcus 6301, cuando la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad se incubaba con fosfodiesterasa, enzima capaz de reactivar las glutamina sintetasas adenililadas, no se produce aumento de la actividad por encima del control sin adición.

Algunas proteínas fotomoduladas responden a mecanismos de fosforilación (5), y en Synechococcus 6301 se ha descrito la presencia de fosfatasa regulables in vitro por oxidación-reducción (50). Sin embargo, al igual que ocurría con la fosfodiesterasa, la incubación de glutamina sintetasa con fosfatasa alcalina no produce aumento significativo de su actividad. Podemos descartar, por tanto, con estos datos, que la regulación de la glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 en transiciones luz-oscuridad se deba a adenililación o a fosforilación.

Los experimentos descritos en este trabajo proporcionan una descripción del comportamiento de la glutamina sintetasa en oscuridad, y caracterizan el proceso de regulación. La elucidación del mecanismo por el cual éste se lleva a cabo, tanto a nivel de factor desencadenante como a nivel bioquímico (modificación sufrida por la enzima) requiere un estudio más detallado in vitro. El mayor inconveniente encontrado hasta ahora para ello ha sido la dificultad encontrada para obtener extractos de células con la glutamina sintetasa inactivada por oscuridad que

mantuvieran los mismos bajos niveles de glutamina sintetasa detectados in situ.



V. CONCLUSIONES

- 1.- Las actividades de las enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno en cianobacterias, glutamina sintetasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa, se pueden determinar fácilmente, tanto in situ en células permeabilizadas, como in vitro, empleando para el análisis cromatografía líquida de alta presión. El método es altamente repetitivo, muy sensible y rápido de llevar a cabo.
- 2.- En Synechococcus 6301 está presente una sola enzima con actividad glutamato sintasa, que emplea ferredoxina como donador de electrones y es estrictamente dependiente de la presencia de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato para la producción de glutamato. El nivel de esta actividad, así como la ausencia de glutamato deshidrogenasa en este organismo, apoyan el funcionamiento de la vía GS-GOGAT como ruta principal de asimilación de amonio en Synechococcus 6301. La enzima no parece estar regulada por cambios en la fuente de nitrógeno.
- 3.- Se ha purificado a homogeneidad la ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301, primer organismo procariótico fotosintético en que se lleva a cabo. El procedimiento de purificación incluye, como pasos principales, precipitación fraccionada con etanol y cromatografía de afinidad en ferredoxina-sefarosa, obteniéndose una enzima homogénea con una actividad específica de 30 U/mg de proteína.
- 4.- La ferredoxina-glutamato sintasa de Synechococcus 6301 es una flavoproteína que contiene una sola molécula de FMN como grupo prostético. Está compuesta de una única cadena polipeptídica, de peso molecular 158 kDa, y en la forma nativa muestra un espectro de absorción con picos a los 279, 370 y 438 nm, y hombros a 418 y 476 nm. Sus características moleculares son, en general, muy semejantes a las de proteínas aisladas de otras fuentes.
- 5.- La glutamina sintetasa de Synechococcus 6301 está sometida a regulación por condiciones de luz-oscuridad, siendo activa en células creciendo a la luz y con nitrato como fuente de nitrógeno, e inactiva en la oscuridad. El mecanismo de

regulación es un fenómeno de inactivación-reactivación que no implica degradación o síntesis de novo de la enzima. En el proceso interviene el flujo de electrones entre los fotosistemas II y I, siendo independiente de la carga energética de la célula.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADACHI, K. and A. SUZUKI. 1977. Purification and properties of glutamate synthase from Thiobacillus thioparus. J. Bacteriol. 129: 1173-1182.
- 2.- ALLEN, M.B. and D.I. ARNON. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I: Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm.. Plant Physiol. 30: 366-372.
- 3.- ALLEN, M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. 4: 1-4.
- 4.- ANDERSON, J.W. and J. DONE. 1977. A polarographic study of glutamate synthase activity in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 60: 354-359.
- 5.- ANDERSON, L.E. 1986. Light/dark modulation of enzyme activity in plants. Adv. Bot. Res. 12: 1-46.
- 6.- ANDREWS, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96: 595-606.
- 7.- ARIMA, Y. 1978. Glutamate synthase in rice root extracts and the relationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. Plant and Cell Physiol. 19: 955-961.
- 8.- ARNON, D.I., B.D. Mc SWAIN, H.Y. TSUJIMOTO and K. WADA. 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. Biochim. Biophys. Acta 357: 231-245.
- 9.- AVILA, C. 1987. Regulación y estudio comparado de glutamato sintasas de plantas superiores. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- 10.- AVILA, C., J.R. BOTELLA, F.M. CANOVAS, I. NUÑEZ DE CASTRO and V. VALPUESTA. 1987. Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of Lycopersicon esculentum. Plant Physiol. 85: 1036-1039.
- 11.- AVILA, C., F. CANOVAS, I. NUÑEZ DE CASTRO and V. VALPUESTA. 1984. Separation of two forms of glutamate synthase in leaves of tomato (Lycopersicon esculentum). Biochem. Biophys. Res. Comm. 122: 1125-1130.
- 12.- BAILEY, J.L. 1967. Techniques in protein chemistry (2<sup>nd</sup> edn.) p. 340. Elsevier, Amsterdam.
- 13.- BEEVERS, L. and R. STOREY. 1976. Glutamate synthase in developing cotyledons of Pisum sativum. Plant Physiol. 57: 862-866.

- 14.- BENNETT, J. 1979. Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent. *FEBS Lett.* 103: 342-344.
- 15.- BERGMAN, B., P. LINDBLAD, A. PETTERSON, E. RENSTRÖM and E. TIBERG. 1985. Immuno-gold localization of glutamine synthetase in a nitrogen-fixing cyanobacterium (Anabaena cylindrica). *Planta* 166: 329-334.
- 16.- BERGMAYER, H.U., M. GRASSL and H.-E. WALTER. 1983. in: "Methods of enzymatic analysis". Third edition. Vol. II, pp. 126-328. Bergmeyer (Ed.). Verlag Chemie, Weinheim.
- 17.- BHALLA, P. and J. BENNETT. 1987. Chloroplast phosphoproteins: phosphorylation of a 12 kDa stromal protein by the redox-controlled kinase of thylakoid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 252: 97-104.
- 18.- Bio-Rad protein assay. 1979. Instruction manual. BIO-RAD LABORATORIES, Richmond, California.
- 19.- BOLLAND, M.J. and A.G. BENNY. 1977. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* 79: 355-362.
- 20.- BORNEFELD, T. 1976. The rates of photophosphorylation of the blue-green alga Anacystis nidulans at transition from dark to light. I. Rates under conditions of cyclic, pseudo-cyclic, and non-cyclic electron flow and in presence and absence of DCMU [3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] and desaspidin. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 170: 333-344.
- 21.- BOTTOMLEY, P.J. and W.D.P. STEWART. 1976. ATP pools and transients in the blue-green alga, Anabaena cylindrica. *Arch. Microbiol.* 108: 249-258.
- 22.- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 23.- BREWER, J.M., A.J. PESCE and T.E. SPENCER. 1974. "Experimental techniques in biochemistry". Hager and Wold (Eds.) Prentice Hall, New Jersey.
- 24.- BUCHANAN, B.B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 341-374.
- 25.- BUCHANAN, J.M. 1973. The amidotransferases. *Advan. Enzymol.* 39: 91-183.
- 26.- CANDAU, P. 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria A. nidulans. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

- 27.- CHIU, J.Y. and P.D. SHARGOOL. 1979 Importance of glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 63: 409-415.
- 28.- CLELAND, W.W. 1970. Steady state kinetics. in: "The enzymes", Vol. II, 3<sup>rd</sup> edn. Boyer (Ed.), pp. 1-65. Academic Press, New York.
- 29.- COMMERE, B., J. VIDAL, A. SUZUKI, P. GADAL and M. CABOCHE. 1986. Detection of the messenger RNA encoding for the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *Plant Physiol.* 80: 859-862.
- 30.- CORONIL, T. 1985. Determinación de niveles intracelulares de intermediarios del metabolismo fotosintético en la cianobacteria Anacystis nidulans. Tesina de Licenciatura. Universidad de Sevilla.
- 31.- COSSAR, J.D., P. ROWELL and W.D.P. STEWART. 1984. Thioredoxin as a modulator of glucose-6-phosphate dehydrogenase in a N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium. *J. Gen. Microbiol.* 130: 991-998.
- 32.- CSEKE, C., A. BALOG and G. FARKAS. 1981. Redox modulation of glucose-6-P dehydrogenase in A. nidulans and its "uncoupling" by phage infection. *FEBS Lett.* 126: 85-88.
- 33.- CULLIMORE, J. V. and A.P. SIMS. 1981. Occurrence of two forms of glutamate synthase in Chlamydomonas reinhardtii. *Phytochemistry* 20: 597-600.
- 34.- DHARMAWARDENE, M.W.N., A. HAYSTEAD and W.D.P. STEWART. 1973. Glutamine synthetase of the nitrogen-fixing alga Anabaena cylindrica. *Arch. Microbiol.* 90: 281-295.
- 35.- DOOLITTLE, W.F. and R.A. SINGER. 1974. Mutational analysis of dark endogenous metabolism in the blue-green bacterium Anacystis nidulans. *J. Bacteriol.* 119: 677-683.
- 36.- DOUGALL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 58: 639-646.
- 37.- DUGGAN, J.X. and L.E. ANDERSON. 1975. Light-regulation of enzyme activity in Anacystis nidulans (Richt.). *Planta* 122: 293-297.
- 38.- EYZAGUIRRE, J. 1987. Chemical modification of enzymes - an overview. The use of group-specific reagents. in: "Chemical modification of enzymes: active site studies". Eyzaguirre (Ed.). pp. 9-22. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- 39.- FAEDER, E.J. and L.M. SIEGEL. 1973. A rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixtures. *Anal. Biochem.* 53: 332-336.

- 40.- FISHER, R., R. TULI and R. HASELKORN. 1981. A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in Escherichia coli, but the enzyme is not adenylylated." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3393-3397.
- 41.- FLORENCIO, F.J., S. MARQUES and P. CANDAU. 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. FEBS Lett., 223: 37-41.
- 42.- FLORENCIO, F.J. and J.L. RAMOS. 1985. Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta 838: 39-48.
- 43.- FLORES, E. 1982. Utilización de nitrato por la cianobacteria Anacystis nidulans. Mecanismo de regulación. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- 44.- FLORES, E., J.L. RAMOS, A. HERRERO and M.G. GUERRERO. 1983. Nitrate assimilation by cyanobacteria. in: "Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function". Papageorgiou and Packer (Eds.). pp. 363-387. Elsevier Biomedical, New York.
- 45.- FOWLER, M.W., W. JESSUP and G.S. SARKISSIAN. 1974. Glutamate synthase type activity in higher plants. FEBS Lett. 46: 340-342.
- 46.- FRIEDMANN, H.C. and B. VENNESLAND. 1960. Crystalline dihydroorotic dehydrogenase. J. Biol. Chem. 235: 1526-1532.
- 47.- GALVAN, F., A.J. MARQUEZ and J.M. VEGA. 1984. Purification and molecular properties of ferredoxin-glutamate synthase from Chlamydomonas reinhardtii. Planta 162: 180-187.
- 48.- GEARY, L.E. and A. MEISTER. 1977. On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate catalyzed by glutamate synthase. J. Biol. Chem. 252: 3501-3508.
- 49.- GLEASON, F.K. and A. HOLMGREN. 1981. Isolation and characterization of thioredoxin from the cyanobacterium, Anabaena sp. J. Biol. Chem. 256: 8306-8309.
- 50.- GODEH, M., J. UDVARDY and G.L. FARKAS. 1981. Redox modulation of a phosphatase from Anacystis nidulans. Planta 152: 408-414.
- 51.- GOLD, A.M. 1967. Sulfonylation with sulfonyl halides. Methods Enzymol. 11: 706-711.
- 52.- GOTOR, C. 1988. Estudios de regulación e inmunológicos de las glutamato sintasas del alga verde Chlamydomonas reinhardtii. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.



- 53.- GUERRERO, M.G. and C. LARA. 1987. Assimilation of inorganic nitrogen. in: "The cyanobacteria". Fay and Van Baalen (Eds.), pp. 163-186. Elsevier, Amsterdam.
- 54.- GUPTA, M. and N.G. CARR. 1981. Detection of glutamate synthase in heterocysts of Anabaena sp. strain 7120. J. Bacteriol. 148: 980-982.
- 55.- HAGER, K.-P, G. DANNEBERG and H. BOTHE. 1983. The glutamate synthase in heterocysts of Nostoc muscorum. FEMS Microbiol. Lett. 17: 179-183.
- 56.- HAROLD, F.N., J.R. BAARDA, C. BARON and A. ABRAMS. 1969. Inhibition of membrane-bound adenosine triphosphatase and of cation transport in Streptococcus faecalis by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. 244: 2261-2268.
- 57.- HARNISCHFEGER, G. and G.A. CODD. 1978. Factors affecting energy transfer from phycobilisomes to thylakoids in Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta 502: 507-513.
- 58.- HATTORI, A. and J. MYERS. 1967. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. II. Reduction of nitrate to nitrite. Plant Cell Physiol. 8: 327-337.
- 59.- HAYSTEAD, A., M.W.N. DHARMAWARDENE and W.D.P. STEWART. 1973. Ammonia assimilation in nitrogen-fixing blue-green alga. Plant Science Lett. 1: 439-445.
- 60.- HELENIUS, A. and K. SIMONS. 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79.
- 61.- HEMMILÄ, I.A. and P.I. MANTSALA. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from Bacillus megaterium. Biochem. J. 173: 45-52.
- 62.- HERDMAN, M., S.F. DELANEY and N.G. CARR. 1973. A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga Anacystis nidulans. J. Gen. Microbiol. 79: 233-237.
- 63.- HERRERO, A. 1983. Regulación de los niveles celulares de los enzimas del sistema de reducción del nitrato en cianobacterias. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 64.- HERTIG, C.M. and R.A. WOLOSUIK. 1983. Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. J. Biol. Chem. 258: 984-989.
- 65.- HIRASAWA, M. and G. TAMURA. 1984. Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. J. Biochem. 95: 983-994.

- 66.- HO, K.K. and D.W. KROGMANN. 1982. Photosynthesis. En: "The biology of cyanobacteria". Carr and Whitton (Eds.). pp. 191-214. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 67.- HOARE, D.S., S.L. HOARE and R.B. MOORE. 1967. The photoassimilation of organic compounds by autotrophic blue-green algae. J. Gen. Microbiol. 73: 317-326.
- 68.- HOTTA, S.S. 1968. Oxidative metabolism of isolated brain mitochondria: changes caused by aminooxiacetate. Arch. Biochem. Biophys. 127: 132-139.
- 69.- HUMMELT, G. and J. MORA. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 96: 1688-1694.
- 70.- HWA KIM, K. and SUE GOO RHEE. 1987. Subunit interaction elicited by partial inactivation with L-methionine sulfoximine and ATP differently affects the byosynthetic and -glutamyltransferase reactions catalyzed by yeast glutamine synthetase. J. Biol. Chem. 262: 13050.
- 71.- IDA, S. 1977. Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin-sepharose affinity chromatography. J. Biochem. 82: 915-918.
- 72.- IHLENFELDT, M.J.A. and J. GIBSON. 1975. CO<sub>2</sub> fixation and its regulation in Anacystis nidulans (Synechococcus). Arch. Microbiol. 102: 13-21.
- 73.- JACQUOT, J.-P. 1984. Post-translational modifications of proteins in higher plant chloroplasts: enzyme regulation by thiol-disulfide interchange. Physiol. Vég. 22: 487-507.
- 74.- JAMES, G.T. 1978. Inactivation of the protease inhibitor PMSF in buffers. Anal. Biochem. 86: 574-579.
- 75.- JOVIN, T., A. CHRAMBACH and M.A. NAUGHTON. 1964. Apparatus for preparative temperature regulated polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 9: 351-364.
- 76.- KABUS, P. and G. KOCH. 1982. Quantitative determination of aminoacids in tissue culture cells by high performance liquid chromatography. Biochem. Biophys. Res. Comm. 108: 783-790.
- 77.- KERBY, N.W., S.C. MUSGRAVE, P. ROWELL, S.V. SHESTAKOV and W.D.P. STEWART. 1986. Photoproduction of ammonium by immobilized mutant strains of Anabaena variabilis. Applied Microbiol. Biotechnol. 24: 42-46.
- 78.- KHANNA, S. and D.J.D. NICHOLAS. 1983. Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum. Arch. Microbiol. 134: 98-103.

- 79.- KOZIOL, J. 1971. Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes. *Methods Enzymol.* 18(b): 253-285.
- 80.- KRATZ, W.A. and J. MYERS. 1955. Nutrition and growth of several blue-green algae. *Amer. J. Bot.* 42: 282-287.
- 81.- LAURENT, T.C. and J. KILLANDER. 1964. A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatog.* 14: 317-330.
- 82.- LEA, P.J. and B.J. MIFLIN. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251: 614-616.
- 83.- LEA, P.J. and B.J. MIFLIN. 1975. The occurrence of glutamate synthase in algae. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64: 856-862.
- 84.- LEA, P.J. and B.J. MIFLIN. 1975. Glutamate synthase in blue-green algae. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 381-384.
- 85.- LEA, P.J., W.R. MILLS, R.M. WALLSGROVE and B.J. MIFLIN. 1982. Assimilation of nitrogen and synthesis of aminoacids in chloroplasts and cyanobacteria (blue-green algae). in: "On the origins of chloroplasts". Schiff (ed.). pp. 149-178. Elsevier North Holland, New York.
- 86.- LEURENTOP, L., F.J. FLORENCIO and J.-P. VERBELEN. 1986. A structural study of glutamine synthetase of Anacystis nidulans by electron microscopy. "Advanced Course on Inorganic Nitrogen Metabolism", Jarandilla de la Vera, Abstract p. 78.
- 87.- LI, J., C.-Z. HU and D.C. YOCH. 1987. Changes in aminoacid and nucleotide pools of Rhodospirillum rubrum during switch-off of nitrogenase activity initiated by NH<sub>4</sub> or darkness. *J. Bacteriol.* 169: 231-237.
- 88.- LIGHT, D.R., C. WALSH and M.A. MARLETTA. 1980. Analytical and preparative HPLC separation of flavins and flavin analog coenzymes. *Anal. Biochem.* 109: 87-93.
- 89.- LINDROTH, P. and K. MOPPER. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* 51: 1667-1674
- 90.- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 91.- LUBBERDING, H.J. and W. SCHROTEN. 1984. The ATP level in the thermophilic cyanobacterium Synechococcus 6716 during light-dark transition and in the presence of some specific inhibitors. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 93-96.

- 92.- MC KENZIE, G.H., A.L. CH'NG and K.R. GAYLER. 1979. Glutamine synthetase/glutamine: $\alpha$ -ketoglutarate aminotransferase in chloroplasts from the marine alga Caulerpa simpliciuscula. *Plant Physiol.* 63: 578-582.
- 93.- MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- 94.- MANZANO, C. 1977. La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde-azulada Anacystis nidulans. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 95.- MANZANO, C., P. CANDAU and M.G. GUERRERO. 1978,. Affinity chromatography of Anacystis nidulans ferredoxin-nitrate reductase and NADP reductase on reduced ferredoxin-sepharose. *Anal. Biochem.* 90: 408-412.
- 96.- MARKWELL, M.A., S.M. HAAS, L.L. BIEBER and N.E. TOLBERT. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- 97.- MARQUEZ, A.J. 1985. Biosíntesis de glutamato en Chlamydomonas reinhardii. Purificación y propiedades de las enzimas con actividad glutamato sintasa. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 98.- MARQUEZ, A.J., F. GALVAN and J.M. VEGA. 1984. Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from Chlamydomonas reinhardii. *Plant Science Lett.* 34: 305-314.
- 99.- MARTIN, F., A. SUZUKI and B. HIREL. 1982. A new high-performance liquid chromatography assay for glutamine synthetase and glutamate synthase in plant tissues. *Anal. Biochem.* 125: 24-29.
- 100.- MARTIN, R.G. and B.N. AMES. 1961. A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379.
- 101.- MATOH, T., S. IDA and E. TAKAHASHI. 1980. Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (Pisum sativum L.). *Plant Cell Physiol.* 21: 1461-1474.
- 102.- MATOH, T., F. SUZUKI and S. IDA. 1979. Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. *Plant and Cell Physiol.* 20: 1329-1340.
- 103.- MATSUOKA, K. and K. KIMURA. 1986. Glutamate synthase from Bacillus subtilis PCI 219. *J. Biochem.* 99: 1087-1100.
- 104.- MEEKS, J.C., C.P. WOLK, W. LOCKAU, N. SCHILLING, P.W. SHAFFER and W. S. CHIEN. 1978. Pathways of assimilation of [ $^{13}\text{N}$ ]N<sub>2</sub> and  $^{13}\text{NH}_4$  by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134: 125-130.

- 105.- MEEKS, J.C., C.P. WOLK, J. THOMAS, W. LOCKAU, P.W. SHAFFER, S.M. AUSTIN, W.-S. CHIEN and A. GALONSKY. 1977. The pathway of assimilation of  $^{13}\text{NH}_4$  by the cyanobacterium, Anabaena cylindrica. J. Biol. Chem. 252: 7894-7900.
- 106.- MILLER, R.E. and E.R. STADTMAN. 1972. Glutamate synthase from Escherichia coli. An iron sulfide flavoprotein. J. Biol. Chem. 247: 7409-7417.
- 107.- MISRA, S. and A. OAKS. 1985. Ferredoxin and pyridine nucleotide-dependent glutamate synthase activities in maize endosperm tissue. Plant Science 39: 1-5.
- 108.- MIYAKATE, K. and S. KITAOKA. 1981. NADH-dependent glutamate synthase in Euglena gracilis z.. Agric. Biol. Chem. 45: 1727-1729.
- 109.- MORTON, R.A. 1975. "Biochemical spectroscopy" Vol. 2, pp. 427-435. Adam Hilger, London.
- 110.- NEILSON, A.H. and M. DOUDOROFF. 1973. Ammonia assimilation in blue-green algae. Arch. Microbiol. 89: 15-22.
- 111.- ORR, J. and R. HASELKORN. 1981. Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium Anabaena 7120. J. Biol. Chem. 256: 13099-13104.
- 112.- ORR, J., L.M. KEEFER, P. KEIM, T.D. NGUYEN, T. WELLEMS, L. HEINRIKSON and R. HASELKORN. 1981. Purification, physical characterization and  $\text{NH}_2$ -terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium Anabaena 7120. J. Biol. Chem. 256: 13091-13098.
- 113.- PADAN, E., D. ZILBERSTEIN and H. ROTTENBERG. 1976. The proton electrochemical gradient in Escherichia coli cells. Eur. J. Biochem. 63: 533-541.
- 114.- PEARCE, J., C.K. LEACH and N.G. CARR. 1969. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga Anabaena variabilis. J. Gen. Microbiol. 55: 371-378.
- 115.- PELROY, R.A. and J.A. BASSHAM. 1972. Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue-green algae. Arch. Microbiol. 86: 25-38.
- 116.- PELROY, R.A., R. RIPPKA and R.Y. STANIER. 1972. Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. Arch. Microbiol. 87: 303-322.
- 117.- PENEFSKY, H.S. 1977. Reversible binding of  $\text{P}_i$  by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252: 2891-2899.
- 118.- PINKUS, L.M. 1977. Glutamine binding sites. Methods Enzymol. 46: 414-427.

- 119.- PISHAK, M.R. and A.T. PHILLIPS. 1979. A modified radioisotopic assay for measuring glutamine synthetase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 94: 82-88.
- 120.- PLUMMER, D.T. 1971. "An introduction to practical biochemistry". Ma Graw-Hill, London.
- 121.- POPE, M.P., S.A. MURRELL and P.W. LUDDEN. 1985. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from Rhodospirillum rubrum by adenosine diphosphoribosylation of a specific arginine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3173-3177.
- 122.- RAI, A.N., P. ROWELL and W.D.P. STEWART. 1982. Glutamate synthase activity of heterocysts and vegetative cells of the cyanobacterium Anabaena variabilis Kütz. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2203-2205.
- 123.- RAJAGOPALAN, K.V. and P. HANDLER. 1964. The absorption spectra of iron-flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 239: 1509-1514.
- 124.- RAMOS, J.L. 1981. Bioconversión de energía solar en energía química: fotoproducción de amoníaco por algas verde-azuladas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 125.- RATTI, S., B. CURTI, G. ZANETTI and E. GALLI. 1985. Purification and characterization of glutamate synthase from Azospirillum brasilense. *J. Bacteriol.* 163: 724-729.
- 126.- RHODES, D., G.A. RENDON and G.R. STEWART. 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemna minor. *Planta* 129: 203-210.
- 127.- RIPPKA, R., J. DERUELLES, J.B. WATERBURY, M. HERDMAN and R.Y. STANIER. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- 128.- ROGNSTAD, R. and D.G. CLARK. 1974. Effects of aminooxyacetate on the metabolism of isolated liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 638-646.
- 129.- ROON, R.J., H.L. EVEN and F. LARIMORE. 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dependent enzyme from Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* 118: 89-95.
- 130.- ROTH, M. 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* 43: 880-882.
- 131.- ROWELL, P., S. ENTICOTT and W.D.P. STEWART. 1977. Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga Anabaena cylindrica. *New Phytol.* 79: 41-45.

- 132.- ROWELL, P., M.J.A.M. SAMPAIO, J.K. LADHA and W.D.P. STEWART. 1979. Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity in vivo in response to light and  $\text{NH}_4$ . Arch. Microbiol. 120: 195-200.
- 133.- ROWELL, P. and W.D.P. STEWART. 1976. Alanine dehydrogenase of the  $\text{N}_2$ -fixing blue-green alga, Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 107: 115-124.
- 134.- SAMPAIO, M.J.A.M., P. ROWELL and W.D.P. STEWART. 1979. Purification and some properties of glutamine synthetase from the nitrogen fixing cyanobacteria Anabaena cylindrica and a Nostoc sp.. J. Gen. Microbiol. 111: 181-191.
- 135.- SCHMIDT, A. 1980. Isolation of two thioredoxins from the cyanobacterium Synechococcus 6301. Arch. Microbiol. 127: 259-265.
- 136.- SCHMIDT, A. 1981. A thioredoxin-activated fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium Synechococcus 6301. Planta 152: 101-104.
- 137.- SCHMIDT, A. 1981. The role of thioredoxins for the enzyme regulation in cyanobacteria. in: "Biology of inorganic nitrogen and sulfur". Bothe and Trebst (Eds.). pp. 327-333. Springer-Verlag, Berlin.
- 138.- SCHMIDT, A. and U. CHRISTEN. 1979. Distribution of thioredoxins in cyanobacteria. Z. Naturforsch. 34c: 1272-1274.
- 139.- SCHMIDT, A. and E. KRAMER. 1983. A membrane bound cysteine oxydase from the cyanobacterium Synechococcus 6301. Z. Naturforsch. 38c: 446-450.
- 140.- SCHREIER, H.J. and R.W. BERNLOHR. 1984. Purification and properties of glutamate synthase from Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 160: 591-599.
- 141.- SCOPES, R. 1982. "Protein purification. Principles and methods." Springer-Verlag, New-York.
- 142.- SERRANO, A. 1986. Characterization of cyanobacterial ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase molecular heterogeneity using chromatofocusing. Anal. Biochem. 154: 441-448.
- 143.- SHAPIRO, B.M., H.S. KINGDOM and E.R. STADTMAN. 1967. Regulation of glutamine synthetase, VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties. Biochemistry 58: 642-649.
- 144.- SHAPIRO, B.M. and E.R. STADTMAN. 1970. Glutamine synthetase (Escherichia coli). Methods Enzimol. 17a: 910-922.

- 145.- SHIN, M. 1971. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from spinach. *Methods Enzymol.* 23: 440-447.
- 146.- SIEGEL, L.M. and K.J. MONTY. 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 reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 112: 346-362.
- 147.- SMILLIE, R.M. and B. ENTSCH. 1971. Phytoflavin. *Methods Enzymol.* 23a: 504-514.
- 148.- SMITH, A.J. 1982. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *in*: "The biology of cyanobacteria", Carr and Whitton (Eds.). pp. 47-85. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 149.- SMITH, A.J., J. LONDON and R.Y. STANIER. 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* 94: 972-983.
- 150.- SNELL, F.D. and C.T. SNELL. 1949. "Colorimetric method of analysis", Vol 3. pp. 804-805. Van Nostrand Co Inc., New York.
- 151.- SOLIOZ, M. 1984. Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 9: 309-312.
- 152.- STACEY, G., F.R. TABITA and C. VAN BAALEN. 1977. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: purification of glutamine synthetase from *Anabaena* sp. strain CA. *J. Bacteriol.* 132: 596-603.
- 153.- STANIER, R.Y. and G. COHEN-BAZIRE. 1977. Photosynthetic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 497-536.
- 154.- STEWART, G.R., MANN, A.F. and P.A. FENTEM. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. *in*: "The biochemistry of plants. Vol. 5. Mifflin (Ed.) pp. 271-327. Academic Press, New York.
- 155.- STEWART, W.D.P., A. HAYSTEAD and M.W.N. DHARMAWARDENE. 1975. Nitrogen assimilation and metabolism in blue-green algae. *in*: "Nitrogen fixation by free-living microorganisms". pp. 129-158. Stewart (Ed.). Cambridge University Press.
- 156.- STOOKEY, L.L. 1970. Ferrozine. A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42: 779-781.
- 157.- SUZUKI, A. and P. GADAL. 1982. Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.* 69: 848-852.



- 158.- SUZUKI, A., J. VIDAL and P. GADAL. 1982. Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. *Plant Physiol.* 70: 827-832.
- 159.- TAMURA, G., M. KANKI, M. HIRASAWA and M. OTO. 1980. The purification and properties of glutamate synthase from spinach leaves, and its dependence on ferredoxin. *Agric. Biol. Chem.* 44: 925-927.
- 160.- TEMPEST, D.W., J.L. MEERS and C.M. BROWN. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117: 405-407.
- 161.- THOMAS, J., J.C. MEEKS, C.P. WOLK, P.W. SHAFFER, S.M. AUSTIN and W.-S. CHIEN. Formation of glutamine from [<sup>15</sup>N]ammonia, [<sup>15</sup>N]dinitrogen, and [<sup>14</sup>C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 129: 1545-1555.
- 162.- TISCHNER, R. and A. SCHMIDT. 1982. A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 70: 113-116.
- 163.- TISCHNER, R. and A. SCHMIDT. 1984. Light mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. *Arch. Microbiol.* 137: 151-154.
- 164.- TRAVIS, R.L., W.R. JORDAN and R.C. HUFFAKER. 1969. Evidence for an inactivating system of nitrate reductase in *Hordeum vulgare* L. during darkness that requires protein synthesis. *Plant Physiol.* 44: 1150-1156.
- 165.- TREBST, A. 1972. Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods Enzymol.* 24: 146-165.
- 166.- UTKILEN, H.C., T. BRISEID and B. ERIKSSON. 1983. Variation in photosynthetic membrane and pigment content with light intensity for *Anacystis nidulans* grown in continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1717-1720.
- 167.- WALLSGROVE, R.M., E. HAREL, P.J. LEA and B.J. MIFLIN. 1977. Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J. Exp. Bot.* 28: 588-596.
- 168.- WALLSGROVE, R.M., P.J. LEA and B.J. MIFLIN. 1979. Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within pea leaf cell. *Plant Physiol.* 63: 232-236.
- 169.- WALLSGROVE, R.M., P.J. LEA and B.J. MIFLIN. 1982. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154: 473-476.

- 170.- WALLSGROVE, R.M., B.J. MIFLIN. 1977. Ferredoxin-Sepharose as an affinity absorbent for the purification of glutamate synthase and other ferredoxin-dependent enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 5: 269-271.
- 171.- WALSBY, A.E. 1974. The isolation of gas vesicles from blue-green algae. *Methods Enzymol.* 31: 678-686.
- 172.- WATERS TECHNICAL BULLETIN. November 1982. "Waters auto.tag™ OPA precolumn derivatization technique".
- 173.- WEBER, K. and M. OSBORN. 1975. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. in: "The proteins". Neurath, Hill and Boeder (Eds.). Vol. 1, pp. 179-221. Academic Press, New York.
- 174.- WINSPEAR, M.J. and A. OAKS. 1983. Automated pre-column aminoacid analyses by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 270: 378-382.
- 175.- WOLK, C.P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* 37: 32-101.
- 176.- WOLK, C.P., J. THOMAS, W. LOCKAU, P.W. SHAFFER, S.M. AUSTIN, W.-S. CHIEN and A. GALONSKY. 1976. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of <sup>15</sup>N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251: 5027-5034.
- 177.- WOOLFOLK, C.A., B.M. SHAPIRO and E.R. STADTMAN. 1966. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 116: 177-192.
- 178.- YEE, B.C., A. DE LA TORRE, N.A. CRAWFORD, C. LARA, D.E. CARLSON and B.B. BUCHANAN. 1981. The ferredoxin/thiorredoxin system of enzyme regulation in a cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* 130: 14-18.
- 179.- YELTON, M.M. and D.C. YOCH. 1981. Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*: characterization of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* 123: 335-342.
- 180.- YUE, R.H., E.A. NOLTMANN and S.A. KUBY. 1969. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from brewers yeast (zwischen ferment). *J. Biol. Chem.* 244: 1353-1364.
- 181.- ZAK, R., G. PRIOR and M. RABINOWITZ. 1979. Assessment of protein synthesis by the use of aminoacyl-tRNA as precursor. *Methods Enzymol.* 59: 310-321.
- 182.- ZIEGLER, H. and I. ZIEGLER. 1965. The influence of light on the NADP<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta* 65: 369-380.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D.<sup>a</sup> *Lidia Marqués Martín*  
titulada "*Estudios sobre la vía de amulación de oxígeno en cianobacterias. Glutamato sintasa y glutamina sintasa de Synechococcus 6301.*"  
acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 7 de Julio 1988

El Vocal,

*[Signature]*  
El Presidente

El Vocal,

*[Signature]*  
El Secretario,

El Vocal,

*[Signature]*  
El Doctorado,

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672522