

CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LA NITRATO REDUCTASA,  
NITRITO REDUCTASA Y GLUTAMINA SINTETASA DE LA BACTERIA  
FOTOTROFICA *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1

+ / 1230

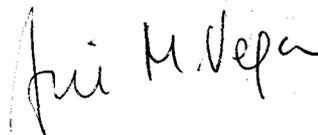
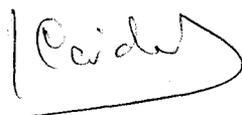
Memoria presentada por el Licenciado D. Francisco J. Caballero Domínguez para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas



Sevilla, marzo de 1984

DIRECTORES

PONENTE



*Francisco Castillo Rodríguez*    *Jacobo Cárdenas Torres*    *José M. Vega Piqueres*  
Prof. Titular de Bioquímica    Catedrático de Bioquímica    Catedrático de Bioquímica

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
FACULTAD DE QUIMICA  
**SECRETARIA**

21 MAR 1984

ENTRADA N.º 157

*A Angeles*

*A mis padres*

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla, que dirige el profesor D. Manuel Losada Villasante, a quien agradezco el haberme acogido en su grupo de investigación.

Asimismo, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los profesores D. Francisco Castillo Rodríguez y D. Jacobo Cárdenas Torres por su constante interés en mi formación científica y humana, así como por la dirección de este trabajo.

Igualmente agradezco al profesor D. José M. Vega Piqueres su amabilidad al hacerse cargo de la ponencia de esta Tesis.

Agradezco su desinteresada aportación y estímulo, así como su labor crítica, a los Dres. Emilio Fernández, Fº Javier Florencio y Norma L. Kerber y a los Ldos. Conrado Moreno-Vivián y Fº Javier Cejudo su colaboración en la obtención de algunos de los resultados presentados.

Al Dr. J.M. Roldán y al Ldo. Fº Romero, del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba, por la obtención de los anticuerpos y la realización de los experimentos de inmunología.

Quiero agradecer también la amistad y la colaboración recibida de mis compañeros José Moreno, Juan Luis, Paco, Elisa, Agustín, Antonio, Silvia, Carlos y Aurelio.

A los demás miembros del Departamento y a las personas que durante estos años han convivido conmigo, especialmente al Dr. M. Mancera, les agradezco la ayuda y el apoyo que en todo momento me han ofrecido.

Por último, quiero agradecer su apoyo económico a las siguientes Instituciones: Ministerio de Educación y Ciencia, Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Comisión Asesora de Investigaciones Científicas y Laboratorios Philips de Holanda.

## INDICE

Abreviaturas .....	IX
I. INTRODUCCION .....	1
II. MATERIALES Y METODOS .....	19
1. ORGANISMO EMPLEADO Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	20
1.1. <i>Cultivo de células</i> .....	20
1.1.1. Condiciones normales de cultivo .....	20
1.1.2. Condiciones especiales de cultivo .....	21
1.1.3. Mantenimiento de las células .....	23
1.1.4. Pureza de los cultivos .....	23
1.2. <i>Recogida de células</i> .....	23
2. ENZIMAS .....	24
2.1. <i>Preparación de extractos acelulares</i> .....	24
2.1.1. Rotura por choque osmótico .....	24
2.1.2. Rotura por ultrasonidos .....	24
2.2. <i>Determinación de actividades enzimáticas de R.</i> <i>capsulata EIF1</i> .....	25
2.2.1. Actividad nitrato reductasa .....	26
2.2.2. Actividad nitrito reductasa .....	26
2.2.3. Actividad glutamina sintetasa .....	27
2.2.3.1. Actividad transferasa .....	27
2.2.3.2. Actividad biosintética .....	28
2.2.4. Actividad dinitrogenasa .....	29
2.3. <i>Determinación de actividades enzimáticas de pro</i> <i>teínas usadas como patrones</i> .....	30
2.3.1. Actividad alcohol deshidrogenasa .....	30
2.3.2. Actividad catalasa .....	30
3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	31
3.1. <i>Determinación de amonio</i> .....	31
3.2. <i>Determinación de etileno</i> .....	31
3.3. <i>Determinación de <math>\gamma</math>-glutamihidroxamato</i> .....	32
3.4. <i>Determinación de nitrato</i> .....	32
3.5. <i>Determinación de nitrito</i> .....	32
3.6. <i>Determinación de proteína</i> .....	33

3.7.	<i>Titulación de grupos -SH</i>	33
3.8.	<i>Medida del crecimiento celular</i>	34
4.	TECNICAS EXPERIMENTALES	34
4.1.	<i>Centrifugación en gradiente de viscosidad</i>	34
4.2.	<i>Cromatografía de filtración en gel</i>	35
4.3.	<i>Cromatografía de afinidad</i>	36
4.4.	<i>Electroforesis</i>	37
4.4.1.	Electroforesis analítica en gel de poli- acrilamida	37
4.4.2.	Tinción de proteína	38
4.4.3.	Detección de la actividad glutamina sin- tetasa	38
4.4.4.	Densitogramas	39
4.5.	<i>Métodos inmunológicos</i>	39
4.5.1.	Doble inmunodifusión	39
4.5.2.	Inmunolectroforesis cruzada	40
4.5.3.	Inmunolectroforesis cuantitativa de co- hete	41
4.5.4.	Tinción de proteína	41
4.5.5.	Tinción de actividad glutamina sintetasa	42
4.6.	<i>Determinaciones espectrofotométricas</i>	42
4.7.	<i>Diálisis de sales y moléculas pequeñas</i>	42
5.	REACTIVOS Y APARATOS	43
5.1.	<i>Procedencia de los reactivos utilizados</i>	43
5.2.	<i>Aparatos</i>	44
III.	RESULTADOS	46
1.	CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES NO <sub>3</sub> Rasa, NO <sub>2</sub> Rasa Y GLUTAMI NA SINTETASA DE CELULAS DE <i>Rhodopseudomonas capsula</i> <i>ta</i> ESTIRPE E1F1 CULTIVADAS EN CONDICIONES FOTOTROFI CAS CON DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO	47
1.1.	<i>Métodos de permeabilización y rotura de células</i>	47
1.2.	<i>Niveles de crecimiento y de actividades enzimá- ticas del sistema reductor de nitrato en dis- tintas fuentes de nitrógeno</i>	47
1.3.	<i>Crecimiento con nitrato, nitrito y amonio</i>	51

1.3.1.	Niveles de actividad nitrato reductasa ..	51
1.3.2.	Efecto sobre la actividad dinitrogenasa .	55
1.3.3.	Niveles de actividad nitrito reductasa ..	55
1.3.4.	Niveles de actividad glutamina sintetasa	58
1.4.	<i>Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas</i> .....	63
2.	CARACTERIZACIÓN <i>in situ</i> DEL SISTEMA DE REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE NITRATO EN CELULAS DE <i>R. capsulata</i> E1F1 .	66
2.1.	<i>Caracterización del ensayo de la actividad nitrato reductasa</i> .....	66
2.1.1.	Donadores de electrones e inhibidores ...	66
2.1.2.	pH óptimo del ensayo .....	70
2.1.3.	Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima .....	70
2.2.	<i>Efecto del volframato sobre el crecimiento y la actividad nitrato reductasa</i> .....	73
3.	CARACTERIZACIÓN <i>in situ</i> DEL SISTEMA DE REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE NITRITO EN CELULAS DE <i>R. capsulata</i> E1F1 .	73
3.1.	<i>Caracterización del ensayo de la actividad nitrito reductasa</i> .....	73
3.1.1.	Donadores de electrones e inhibidores ...	76
3.1.2.	pH óptimo del ensayo .....	81
3.1.3.	Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima .....	81
3.2.	<i>Efecto del hierro sobre el crecimiento y las actividades nitrato y nitrito reductasa</i> .....	81
4.	PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>R. capsulata</i> E1F1 .....	86
4.1.	<i>Precipitación por detergentes</i> .....	86
4.2.	<i>Cromatografía de afinidad en 2',5'-ADPsefarosa</i> ..	86
4.3.	<i>Tabla de purificación</i> .....	89
4.4.	<i>Criterios de pureza</i> .....	89
4.4.1.	Electroforesis analítica .....	89
4.4.2.	Métodos inmunológicos .....	93

5.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>R. capsulata</i> E1F1 .....	97
5.1.	<i>pH</i> óptimo .....	97
5.2.	Temperatura óptima .....	97
5.3.	Estabilidad a distintos <i>pH</i> y temperaturas .....	100
5.4.	Parámetros cinéticos .....	104
5.5.	Parámetros moleculares .....	104
5.5.1.	Radio de Stokes .....	104
5.5.2.	Coefficiente de sedimentación .....	107
5.5.3.	Peso molecular .....	107
5.5.3.1.	Filtración en gel .....	107
5.5.3.2.	Filtración en gel y centrifugación en gradiente de viscosidad .....	110
5.5.3.3.	Electroforesis en geles de acrilamida .....	110
5.5.4.	Coefficiente de fricción y fricción relativa .....	113
5.6.	Titulación de los grupos -SH de la glutamina sintetasa de <i>R. capsulata</i> E1F1 .....	114
6.	ESTUDIOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA EN <i>R. capsulata</i> E1F1 .....	114
6.1.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el grado de adenilación de la glutamina sintetasa .....	117
6.2.	Regulación in vivo de la actividad glutamina sintetasa por amonio y L-alanina .....	120
6.3.	Inactivación in vivo de la glutamina sintetasa por MSX .....	120
6.4.	Efecto de la oscuridad sobre el crecimiento y la actividad glutamina sintetasa .....	123
6.5.	Efecto de distintos aminoácidos sobre la actividad glutamina sintetasa .....	126
6.6.	Efecto del $Mn^{2+}$ sobre la actividad biosintética de la glutamina sintetasa .....	128
6.7.	Efectos antagónicos del PHMB y del DTE sobre la actividad transferasa de la glutamina sintetasa .....	130

IV. DISCUSION .....	136
V. CONCLUSIONES .....	168
VI. BIBLIOGRAFIA .....	172

## Abreviaturas

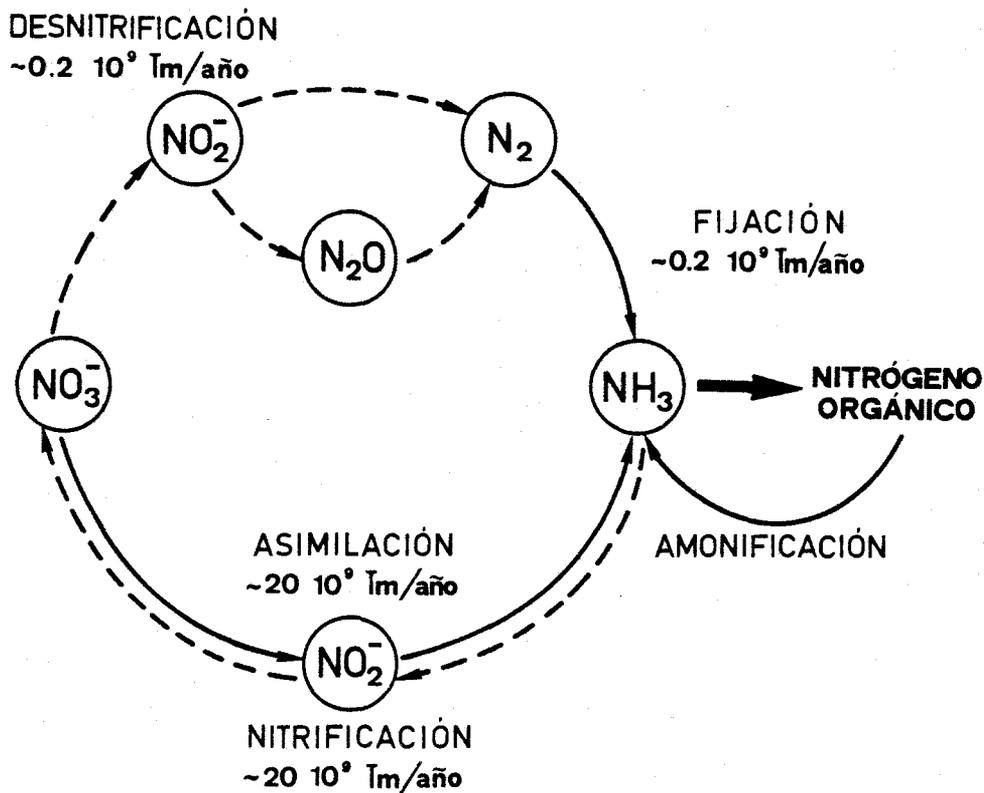
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ala	Alanina
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
As <sub>i</sub>	Arseniato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
cit <i>b</i>	Citocromo <i>b</i>
cit <i>c</i>	Citocromo <i>c</i>
DNasa	Nucleasa del ácido desoxirribonucleico
DTE	Ditioeritritol ( <i>eritro</i> -1,4-dimercapto-2,3-ditiol)
DTT	Ditiotreitol ( <i>treo</i> -1,4-dimercapto-2,3-ditiol)
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$	Coefficiente de extinción milimolar para un paso de luz de 1 cm
E' <sub>0</sub>	Potencial normal de óxido-reducción
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetano sulfónico
HQNO	N-óxido de 2-n-heptil-4-hidroxiquinoleína
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
MES	Acido 4-morfolinoetano sulfónico
MOPS	Acido 4-morfolinopropano sulfónico

MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
MV, MVH	Metil viológeno oxidado y su forma reducida ( ( 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina )
$\bar{n}$	Grado de adenilación
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) oxidado
NAD(P)H	Nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) reducido
NADPRasa	NADP reductasa
NiR o	
NO <sub>2</sub> Rasa	Nitrito reductasa
NR o	
NO <sub>3</sub> Rasa	Nitrato reductasa
PBS	Tampón fosfato salino
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
P <sub>i</sub>	Fosfato
PP <sub>i</sub>	Pirofosfato
S	Unidad Svedberg (10 <sup>-13</sup> s)
S <sub>20, w</sub>	Coefficiente de sedimentación
SDS	Sulfato sódico de dodecilo
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TRICINA	N-tris(hidroximetil)metil glicina
TRIS	Tris(hidroximetil)amino metano
U	Unidad de actividad enzimática
UMP	Uridina 5'-monofosfato
V	Velocidad de reacción
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
Vol	Volumen

## I. INTRODUCCION

El nitrógeno, junto con el carbono, el oxígeno y el hidrógeno, es un elemento imprescindible para la vida, ya que no sólo supone el 14% del peso de las proteínas, sino que, además, forma parte de los ácidos nucleicos, vitaminas, alcaloides y numerosos productos intermediarios del metabolismo.

En la biosfera se presenta en varios estados de oxidación, que van desde +5, en el nitrato, hasta -3, en el amoníaco, las aminas, etc., pudiendo interconvertirse entre estos estados y otros intermedios por los procesos metabólicos que constituyen el ciclo biológico del nitrógeno en la naturaleza (Esquema 1)



Esquema 1.- Ciclo biológico del nitrógeno en la naturaleza.

La asimilación reductiva del nitrato se da en organismos fotosintéticos ( plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas ) y no fotosintéticos ( hongos y bacterias ) (Losada *et al.* 1981) y supone la incorporación a moléculas orgánicas de  $20 \cdot 10^9$  Tm de nitrógeno inorgánico por año, que es sólo un orden de magnitud inferior que la fijación de  $\text{CO}_2$  (Bowen 1966). El proceso inverso ( nitrificación ) lo llevan a cabo dos grupos de bacterias, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones (Stanier *et al.* 1971; Zumft y Cárdenas 1979).

Algunas bacterias reducen nitrato y nitrito utilizándolo como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria en ausencia de oxígeno. Este proceso, denominado desnitrificación, está acoplado a la fosforilación del ADP y produce nitrógeno molecular (Zumft y Cárdenas 1979).

La fijación del dinitrógeno es un proceso asimilador que requiere poder reductor y ATP (Burns y Hardy 1975; Schubert y Wolk 1982). Está restringido a un limitado número de microorganismos libres: algunas cianobacterias y bacterias quimiotróficas, y bacterias fotosintéticas. Existen además algunos ( *Rhizobium*, *Anabaena azollae*,... ) que llevan a cabo la fijación en simbiosis con plantas superiores. Por esta vía se fijan  $10^8$  Tm de nitrógeno por año, cantidad equivalente a la fijación química mediante la síntesis de Haber (Losada *et al.* 1981).

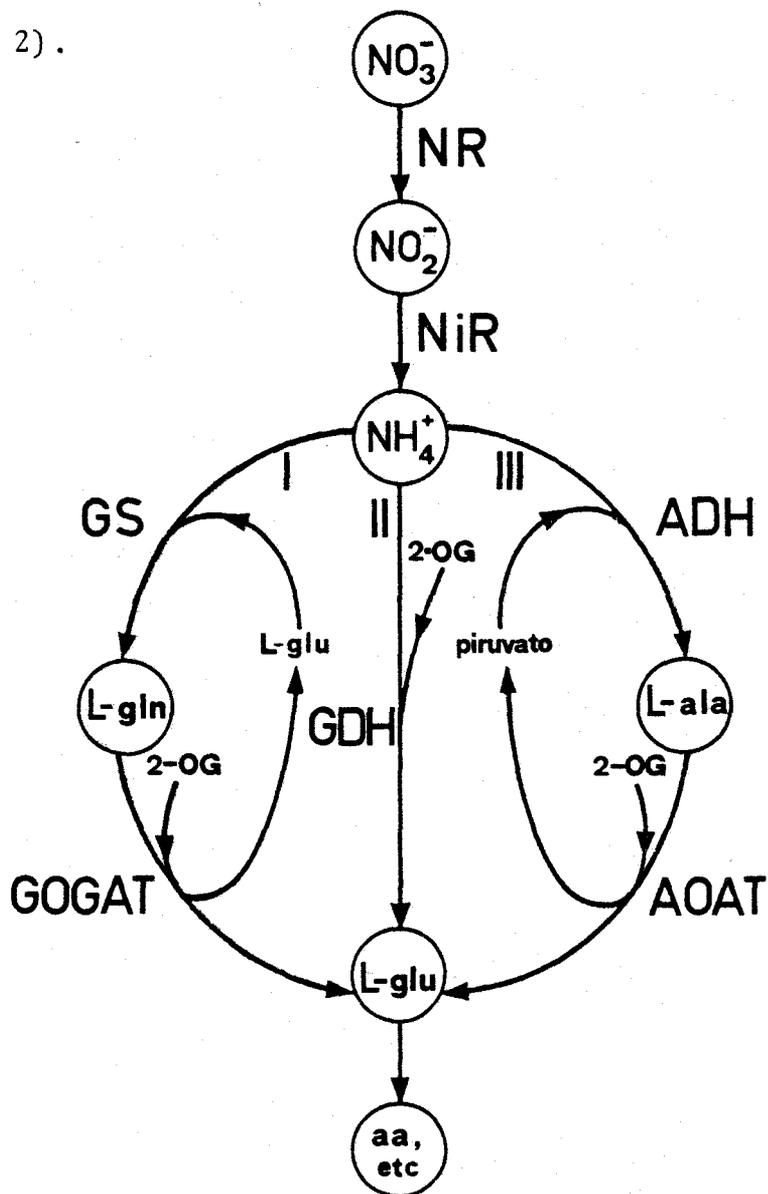
Por último, una serie de microorganismos transforman la materia orgánica del suelo en amoníaco libre, proceso que recibe el nombre de amonificación (Stanier *et al.* 1971).

La importancia del nitrato en organismos fotosintéticos asimiladores radica también en que la asimilación es el proceso limitante en la síntesis de proteínas. Por tanto, el conocimiento y manipulación del proceso puede aumentar el contenido proteico de los organismos con vistas a su posible utilización en la dieta alimentaria.

La asimilación reductiva del nitrato hasta amonio ocurre en dos etapas enzimáticas sucesivas e independientes que requieren dos y seis electrones respectivamente, y que están catalizadas por la nitrato y por la nitrito reductasas, dos metaloenzimas dependientes de ferredoxina o piridín nucleótidos como reductores fisiológicos. En la actualidad está firmemente establecido que la reducción fotosintética del nitrato está más acoplada, al menos en ciertos aspectos, a las reacciones luminosas de la fotosíntesis que la del dióxido de carbono (Losada *et al.* 1981).

Generalmente, el amonio se incorpora a compuestos orgánicos a través de la ruta de la glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa ( GS / GOGAT ), a través de la vía de la glutamato deshidrogenasa ( GDH : aminación reductiva del 2-oxoglutarato ), o a través de ambas (Mifflin y Lea 1977; Stewart y Rhodes 1977; Mifflin *et al.* 1980). En las bacterias fotosintéticas la asimilación de amonio se lleva a cabo fundamentalmente por la ruta GS / GOGAT (Slater y Morris 1974; Johansson y Gest 1976; Brown y Herbert 1977a y b; Herbert *et al.* 1978; Moreno-Vivián *et al.* 1983), aunque en presencia de

amonio, o cuando la GS se encuentra inactiva, puede funcionar la ruta de la alanina deshidrogenasa y de la L-alanina-2-oxoglutarato amino transferasa ( ADH / AOAT ) (Johansson y Gest 1976; Herbert *et al.* 1978; Madigan y Cox 1982; Tolxdorff-Neutzling y Klemme 1982; Moreno-Vivián *et al.* 1983) (Esquema 2).



Esquema 2.- Reducción de nitrato y rutas de incorporación de amonio en microorganismos.

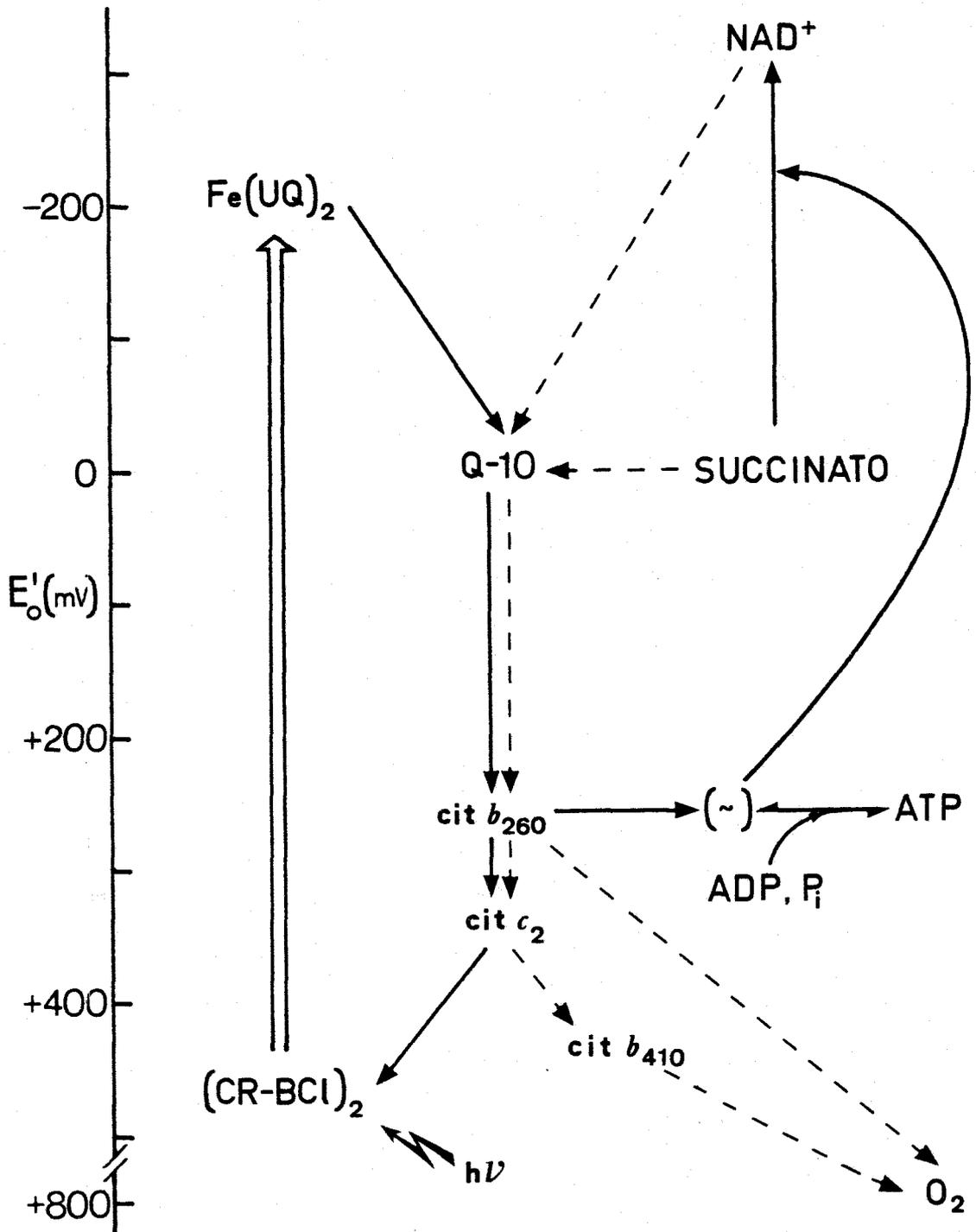
Las rutas II y III requieren sólo 2 electrones, mientras que la ruta I consume además una molécula de ATP por molécula de glutamato. 2-OG, 2-oxoglutarato.

El organismo que se ha utilizado en el presente estudio, *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1, es una bacteria fotosintética roja de la familia *Rhodospirillaceae*. Las rodospiriláceas poseen una gran versatilidad metabólica para adaptarse al medio en el que viven, pudiendo crecer en condiciones fototróficas ( tanto en anaerobiosis estricta como en condiciones microaerófilas ) o quimioorganotróficamente en presencia de oxígeno (Pfennig 1978; Trüper y Pfennig 1978). Llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica con un solo fotosistema, que utiliza donadores de electrones con un potencial redox más bajo que el del agua, como el H<sub>2</sub> o compuestos orgánicos simples como el succinato (Pfennig 1978; Zannoni e Ingledew 1983b).

Las rodospiriláceas son incapaces de generar directamente en la luz un reductor capaz de reducir al NAD<sup>+</sup>, por lo que requieren la aportación de una energía adicional (Dutton y Prince 1978). El papel de la luz es el de producir un estado rico en energía en la membrana que favorece la reducción del NAD<sup>+</sup> a partir del succinato como donador de electrones, proceso que sería termodinámicamente desfavorable en otras condiciones. Este flujo invertido de electrones se ha demostrado en bacterias fotosintéticas (Klemme 1969; Knaff 1978) y también en mitocondrias (Chance y Hollunger 1960).

En condiciones de alta tensión de oxígeno, estas bacterias pueden tener un transporte respiratorio de electrones en el que participa un citocromo *b*<sub>410</sub>, además de elementos comunes con el sistema fotosintético de transporte, como qui

nonas, citocromos  $b_{260}$  y  $c_2$  y centros sulfoférricos (Zannoni e Ingledew 1983b) (Esquema 3).



Esquema 3.- Transporte de electrones en *R. capsulata*.

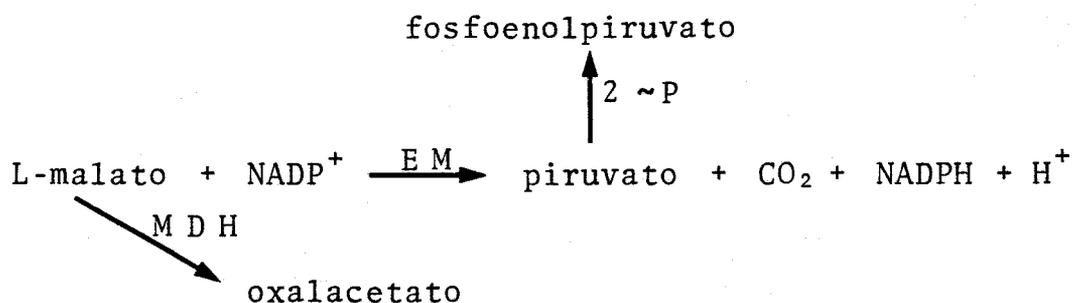
( $\longrightarrow$ ): flujo fotosintético; ( $\dashrightarrow$ ): flujo respiratorio;  
 ( $\sim$ ): estado de alta energía ( gradiente de  $H^+$  ); (Q-10): ubiquinonas;  
 $Fe(UQ)_2$ : complejo hierro - ubiquinona;  $(CR-BCl)_2$ : centro de reacción.

Mediante estudios de resonancia paramagnética de electrones a baja temperatura, utilizando mutantes de *R. capsulata*, Zannoni e Ingledew (1983a) han caracterizado seis de estos centros sulfoferricos unidos a membrana. Cuatro de ellos corresponden a ferredoxinas ( $g = 1.94$ ), de las que dos participan en las reacciones catalizadas por la NADH-deshidrogenasa y tienen unos valores de  $E'_0$  (pH 7.0) de -115 y -370 mV respectivamente, y las otras dos participan en las reacciones de la succinato deshidrogenasa, siendo sus  $E'_0$  (pH 7.0) respectivos de +120 y -280 mV. El quinto de los centros sulfoferricos es una sulfo - ferro proteína de alto potencial (HiPIP,  $g = 2.02$  en estado oxidado y  $E'_0$  (pH 7.0) de +60 mV) que parece ser el centro S-3 de la succinato deshidrogenasa, y que aparentemente está en equilibrio con el transporte fotosintético de electrones. Por último, estos autores han caracterizado otra sulfo - ferro proteína que es un centro de Rieske ( $g = 1.90$  y  $E'_0$  (pH 7.0) = +320 mV) y que está envuelta en el transporte de electrones, tanto en el fotosintético como en el respiratorio.

Las rodosporiláceas poseen como pigmentos fotosintéticos, bacterioclorofilas *a* y *b* y carotenoides del tipo del licopeno y del esferoideno, incluidos en sistemas internos de membrana adosados a la membrana citoplásmica (Kondrat'eva 1963; Pfennig 1978).

Pueden extraer el poder reductor de una serie de compuestos orgánicos más oxidados que el material celular (Pfen

nig 1978). Así el L-malato es metabolizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a través de la malato deshidrogenasa ( MDH ) o bien mediante la acción de la enzima málica ( EM ) (Fuller 1978; Sojka 1978) en las reacciones:



Son capaces, además, de fotoasimilar acetato, piruvato y ácidos dicarboxílicos y, en algunas especies, ácidos grasos, metanol, etanol y azúcares. También pueden utilizar, con gran eficacia, fuentes orgánicas complejas como el extracto de levadura, aunque son incapaces de degradar macromoléculas como el almidón, la celulosa, la pectina, la quitina, etc. (Pfennig 1978).

La información existente sobre el metabolismo del nitrato en bacterias fotosintéticas es escasa y, a menudo, los datos son contradictorios, por lo que no están claras sus implicaciones fisiológicas y ecológicas (Castillo y Cárdenas 1982a). Malofeeva *et al.* (1974) encontraron que *R. palustris* podía crecer en condiciones anaeróbicas estrictas ( atmósfera de H<sub>2</sub> ) en la luz, utilizando nitrato como única fuente de nitrógeno, aunque a una velocidad mucho menor que con amonio o dinitrógeno. Esta capacidad de asimilar nitra-

to se ha descrito también en las estirpes de *R. capsulata* DSM 155, AD2, BK5, Dr1G, R8c, R10 (Klemme 1979) y N22 (Jackson *et al.* 1981), en las de *R. sphaeroides* R8s, HK1 y FH2 (Klemme 1979) y en la estirpe DSM 137 de *R. acidophila* (Herbert *et al.* 1978).

La estirpe PW5 de *R. palustris* es capaz de crecer en la oscuridad anaeróbicamente con una fuente de carbono y amonio, utilizando el ATP producido en la desasimilación reductiva de nitrato a nitrito (Klemme *et al.* 1980). Existen también estirpes de bacterias fotosintéticas desnitrificantes que son capaces de reducir anaeróbicamente en la luz, o en oscuridad,  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{N}_2$  u otros compuestos gaseosos de nitrógeno, creciendo a expensas de amonio y una fuente de carbono. A este grupo pertenecen las estirpes 1a1 y 11/1 de *R. palustris* (Klemme *et al.* 1980) y *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* (Satoh *et al.* 1976; Satoh 1977; Sawada *et al.* 1978).

Hay estirpes que reducen nitrato a nitrito anaeróbicamente en la luz sin asimilar posteriormente éste y sin utilizar la reacción para la respiración anoxigénica. Este tipo de reducción la realizan *R. palustris* DSM 123 y *R. sphaeroides* 2ro, 2rb y DSM 158 (Malofeeva *et al.* 1974; Klemme 1979; Kerber y Cárdenas 1982).

Katoh (1963a y b) y Taniguchi y Kamen (1963) publicaron que la estirpe S1 de *R. rubrum* se podía adaptar al crecimiento con nitrato como única fuente de nitrógeno, tanto en condiciones fototróficas como en aerobiosis - oscuridad. Otros autores, sin embargo, no han podido reproducir estos experi-

mentos trabajando con la misma estirpe (Ketchum y Sevilla 1973; Klemme 1979). También se ha publicado que *R. capsulata* B10 es capaz de asimilar reductivamente el nitrato en la luz (Kelley *et al.* 1980), aunque cuando se intentó cultivar esta bacteria con nitrato, desalojando con argon el dinitrógeno disuelto en el medio, no se obtuvo crecimiento (Perales *et al.* 1981).

Se han caracterizado las nitrato reductasas de algunas de estas bacterias, tanto de tipo asimilador (Alef y Klemme 1977 y 1979; Klemme *et al.* 1981), como desasimilador (Satoh 1977; Klemme *et al.* 1980) y no asimilador (Kerber y Cárdenas 1982), obteniéndose en forma soluble la NR asimiladora de *R. capsulata* AD2 (Wesch y Klemme 1980), la no asimiladora de *R. sphaeroides* DSM 158 (Kerber y Cárdenas 1982) y la desasimiladora de *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* (Satoh 1981) y unida a membrana la NR asimiladora de *R. capsulata* BK5 (Wesch y Klemme 1980). En muchas de estas enzimas el molibdeno es el grupo prostético y las flavinas o los viológenos reducidos actúan como donadores de electrones en la reacción enzimática (Castillo y Cárdenas 1982a).

En cuanto a las nitrito reductasas se han caracterizado varias de tipo desasimilador, así las de *R. palustris* 1a1 y 11/1 (Klemme *et al.* 1980; Preuss y Klemme 1983) y la de *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* (Sawada *et al.* 1978).

A pesar de estos estudios, aun no se conoce con certeza el donador fisiológico de electrones para los procesos de reducción del nitrato y del nitrito en este grupo de bac-

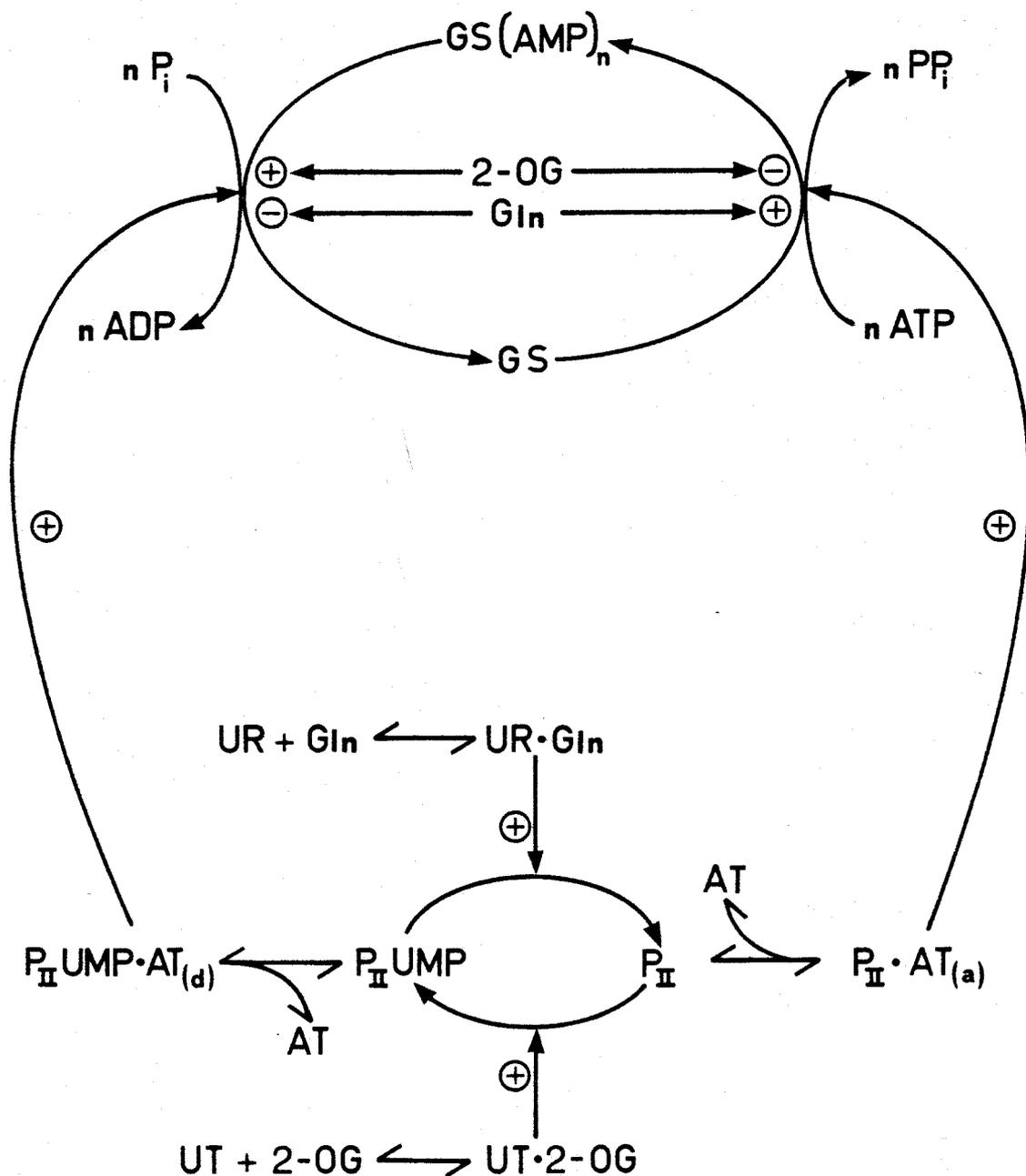
terias fotosintéticas , aunque se han propuesto la ferredoxina reducida (Malofeeva *et al.* 1975) y el NAD(P)H (Katoh 1963a; Taniguchi y Kamen 1963).

En los organismos fotosintéticos, la glutamina sintetasa ( L-glutamato:amonio ligasa (ADP) E.C.6.3.1.2 ) es la enzima que regula la incorporación del nitrógeno inorgánico reducido al glutamato para formar glutamina y, a partir de ésta, diversos aminoácidos y metabolitos importantes (Magasanik y Rothstein 1980). El hecho de que en el lugar de actuación de la GS confluyan el metabolismo del carbono y el del nitrógeno, hace que el estudio del mecanismo de acción de esta enzima, así como el de su regulación, sean imprescindibles para el conocimiento de la asimilación del nitrógeno inorgánico por estos microorganismos.

La actividad GS de *R. capsulata*, como la de la mayoría de las bacterias Gram negativas, está regulada, entre otros mecanismos, por un proceso de modificación covalente ( adenilación - desadenilación ), que depende de la fuente de nitrógeno del medio (Stadtman y Ginsburg 1974) (Esquema 4).

La GS de bacterias se retroinhibe por diversos aminoácidos y productos del metabolismo de la glutamina (Woolfolk y Stadtman 1967; Alef y Zumft 1981; Orr y Haselkorn 1981).

En organismos fotosintéticos la actividad GS se modula *in vivo* por cambios luz - oscuridad, reactivándose con la luz (Rowell *et al.* 1979; Tischner y Hüttermann 1980; Cullimore y Sims 1981; Tischner y Schmidt 1982; Florencio y Vega 1983).



Esquema 4.- Regulación por adenilación - desadenilación de la actividad glutamina sintetasa de bacterias.

GS(AMP)<sub>n</sub> : glutamina sintetasa adenilada; P<sub>II</sub>UMP : proteína P<sub>II</sub> uridilada; AT<sub>(a)</sub> : adenil transferasa adenilante; AT<sub>(d)</sub> : adenil transferasa desadenilante; UR : enzima desuridilante; UT : uridil transferasa; 2-OG : 2-oxoglutarato.

El mecanismo de acción de la enzima de bacterias, es estudiado por Meister (1980), implica la unión secuencial y ordenada a la GS del ATP y, a continuación, del glutamato, en un proceso que requiere la presencia de cationes divalentes. El ATP transfiere un grupo fosfonio al glutamato para formar  $\gamma$ -glutamil fosfato. El complejo enzima :  $\gamma$ -glutamil fosfato reacciona con el amonio para producir, finalmente, glutamina y ADP y regenerar la enzima libre. El papel del ATP es el de facilitar la formación del grupo acilfosfato, dado su alto potencial de transferencia de grupo. En ausencia de ATP, la reacción, al ser fuertemente endergónica, no podría transcurrir en el sentido de la formación de glutamina.

Como inhibidor específico de la GS se ha estudiado el MSX (Ronzio y Meister 1968), cuyo efecto se debe a su carácter de análogo estructural del  $\gamma$ -glutamil fosfato y a que posee, además, un grupo metilo que bloquea el lugar de unión del  $\text{NH}_4^+$  a la enzima irreversiblemente (Meister 1980).

La estructura cuaternaria de la glutamina sintetasa de los diferentes organismos responde a dos tipos fundamentales: en procariotas la enzima consta de 12 subunidades similares, con un peso molecular que oscila entre 570 y 670 kDa (Woolfolk *et al.* 1966; Alef *et al.* 1981; Orr *et al.* 1981; Engelhardt y Klemme 1982), y en eucariotas presenta forma octamérica, con un peso molecular que varía entre 330 y 480 kDa (Meister 1974; Palacios 1976; Hirel y Gadal 1980; Iyer *et al.* 1981; Florencio y Vega 1983), aunque la enzima del alga verde *Chlorella* tiene un peso molecular de 320 kDa y está forma-

da por 6 subunidades semejantes (Rasulov *et al.* 1977). La estructura cuaternaria de la GS de procariotas se ha estudiado también por microscopía electrónica, y consta de dos anillos hexagonales superpuestos, formado cada uno por seis subunidades idénticas, con cierta forma elipsoidal (Valentine *et al.* 1968; Darrow 1980; Alef *et al.* 1981; Orr *et al.* 1981; Engelhardt y Klemme 1982).

Se han descrito dos isoenzimas de la GS en plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> (Guiz *et al.* 1979; Mann *et al.* 1979; Kretovich *et al.* 1981; Hirel y Gadal 1982), algas verdes (Florencio y Vega 1983) y en bacterias no fotosintéticas (Darrow y Knotts 1977; Fuchs y Keister 1980; Wedler *et al.* 1980), habiéndose postulado en la bacteria fotosintética *R. rubrum* (Soliman *et al.* 1982). Estas isoenzimas, denominadas GSI y GSII, se diferencian en sus propiedades físico-químicas, en su localización celular y en su papel fisiológico.

En la obtención de muchos de estos resultados se han empleado técnicas inmunológicas debido, sobre todo, a su especificidad, sensibilidad y sencillez. Mediante el uso de anticuerpos se han localizado diferentes proteínas, por ejemplo la nitrato reductasa asimiladora de *Neurospora crassa* (Roldán *et al.* 1982) o la glutamina sintetasa de hojas de espinaca (Hirel *et al.* 1982). Haciendo uso de su diferente comportamiento inmunológico, se han podido separar las dos isoenzimas de esta última (Hirel *et al.* 1982).

En la presente memoria se recogen los resultados del estudio de la asimilación del nitrato por la bacteria fotosintética *R. capsulata* E1F1, así como la caracterización de las enzimas responsables de su reducción hasta amonio, nitrato y nitrito reductasas, describiéndose por primera vez una nitrito reductasa asimiladora en este tipo de bacterias. También se ha estudiado la incorporación del amonio al glutamato y se ha purificado la glutamina sintetasa mediante un método rápido y eficaz. Se han determinado las propiedades físico-químicas y moleculares de esta enzima, así como sus parámetros cinéticos y las características de la regulación de su síntesis y actividad.

Parte de los resultados expuestos en este trabajo se ha publicado previamente en forma de:

A) Artículos en revistas:

1. Assimilatory nitrite-reductase from *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.

Kerber, N.L., Caballero, F.J. y Cárdenas, J. (1981) *FEMS Microbiol. Lett.* 11, 249-252.

2. Nitrate Photo-Assimilation by the Phototrophic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.

Castillo, F., Caballero, F.J. y Cárdenas, J. (1981) *Z. Naturforsch.* 36c, 1025-1029.

B) Resúmenes presentados a congresos:

1. Caracterización de la nitrato reductasa asimilatoria de la bacteria fototrófica *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.  
Caballero, F.J., Cárdenas, J. y Castillo, F. (1981). *II Congreso FESBE*, res. 463, Madrid.
2. Fotoasimilación del nitrato por la bacteria fototrófica *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.  
Castillo, F., Moreno-Vivián, C., Caballero, F.J. y Cárdenas, J. (1981). *II Congreso FESBE*, res. 464, Madrid.
3. Fijación de dinitrógeno y asimilación de  $\text{NH}_4^+$  por algunas estirpes de rodospiriláceas.  
Perales, M., Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Caballero, F.J., Castillo, F. y Gutierrez-Navarro, A.M. (1981). *VIII Congreso Nacional de Microbiología*, res. 46P, Madrid.
4. Solubilization and partial characterization of an assimilatory nitrite reductase from *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.  
Cárdenas, J., Caballero, F.J., Kerber, N.L. y Castillo, F. (1982). *Special FEBS Meeting*, p. 152, Atenas.
5. Characterization of nitrate and nitrite uptake by the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.  
Caballero, F.J., Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1982). *IV International Sympo*

*sium on Photosynthetic Prokaryotes*, res. B12, Bombannes - Burdeos.

6. Molecular Properties of Glutamine Synthetase from *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.

Cárdenas, J., Caballero, F.J., Florencio, F.J., Cejudo, F.J. y Castillo, F. (1983). *15th FEBS Meeting*, res. S-05 TH-170, Bruselas.

7. Kinetic Parameters of the Glutamine Synthetase from *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1.

Caballero, F.J., Cejudo, F.J., Florencio, F.J., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1983). *1st International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry*, res. P.II.5, Córdoba.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## II.1. ORGANISMO EMPLEADO Y CONDICIONES DE CULTIVO

### II.1.1. *Cultivo de células*

#### II.1.1.1. Condiciones normales de cultivo

Las células de la bacteria fotosintética púrpura *Rhodospirillum rubrum* E1F1 (cedida por el Dr. W.G. Zumft, Universidad de Karlsruhe, R.F.A.) se cultivaron fototróficamente a 30°C en cámaras climatizadas con iluminación continua suministrada por lámparas de filamento de wolframio de 40 W, equivalente a 4 W m<sup>-2</sup>.

El medio de cultivo utilizado fue el RCV descrito por Weaver *et al.* (1975), que contenía por litro: ácido D,L-málico, 4 g; EDTA, 20 mg; MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 200 mg; CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 75 mg; FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 12 mg; clorhidrato de pirofosfato de tiamina, 1 mg; tampón fosfato potásico 0.64 M, pH 6.8, 15 ml; y 1 ml de una solución de oligoelementos que contenía: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 397.5 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 700 mg; Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3 H<sub>2</sub>O, 10 mg; ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 60 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 197.5 mg, disueltos en 250 ml de agua destilada. Como fuentes de nitrógeno se usaron, según los casos, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, L-glutamato, L-glutamina, L-alanina o extracto de levadura, todos a la concentración de 1 g/l, y KNO<sub>2</sub> a concentraciones entre 1 y 10 mM. Cuando la fuente de nitrógeno fue N<sub>2</sub> se utilizó el que había disuelto en el medio de cultivo (unos 14 mg/l a 25°C) o se mantuvo el cultivo saturado mediante borboteo continuo de dicho gas. En todos los casos el pH del medio se ajustó a 6.8 .

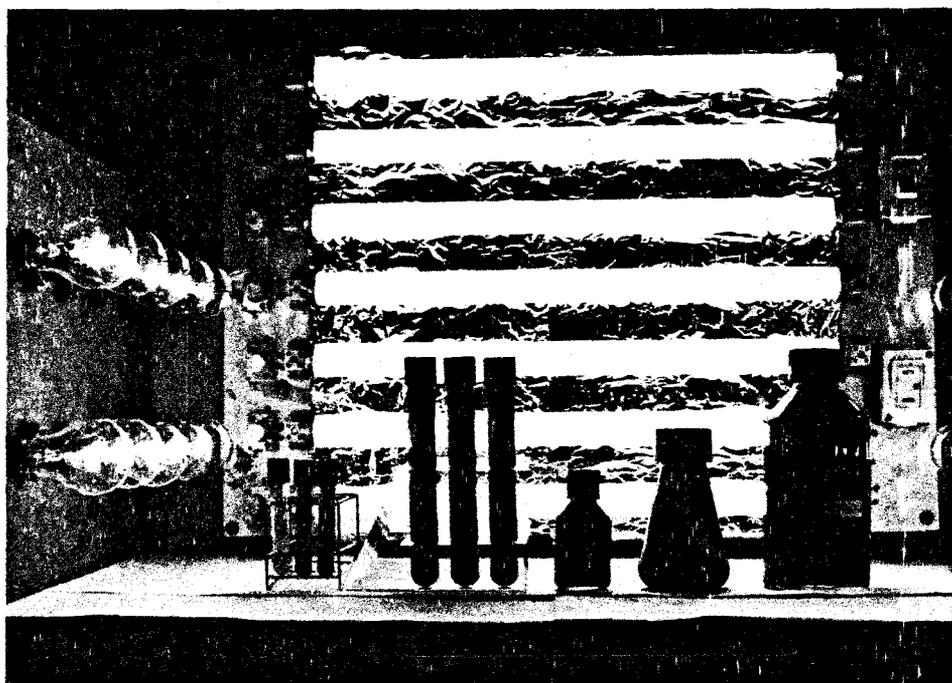
Para los cultivos fototróficos se utilizaron, normalmente, tubos con tapón de rosca de 10, 55 y 125 ml, de cristal PYREX, completamente llenos con medio de cultivo para conseguir la anaerobiosis. En otras ocasiones la anaerobiosis se logró pasando una corriente de argón o de dinitrógeno a través del medio de cultivo, en frascos PYREX de 1 l, dotados de un sistema estéril de entrada y salida de gases.

Para obtener grandes masas de células se prepararon inóculos en frascos de 125 y 250 ml y, a partir de ellos, se cultivaron las células en botellas PYREX de 1, 2 y 5 l de capacidad.

#### II.1.1.2. Condiciones especiales de cultivo

En los estudios de los efectos del molibdeno y del hierro, los medios se prepararon sin estos metales, añadiéndose luego las cantidades de éstos que se indican en cada caso. Las células que se inocularon en estos medios provenían de cultivos sucesivos en medios carentes de  $\text{MoO}_4^{=}$  o de  $\text{Fe}^{2+}$ , y con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno.

Las bacterias se cultivaron en aerobiosis y oscuridad en un agitador NEW BRUNSWICK G-25, a una temperatura controlada de  $30^\circ\text{C}$  y con una agitación constante de 200 rpm. Las condiciones heterotróficas de cultivo se consiguieron mediante una atmósfera de aire en matraces de 500 ml que contenían 125 ml del medio R C V antes descrito, cerrados con algodón estéril.



*Instalación utilizada para el cultivo de células de Rhodopseudomonas capsulata EIF1 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla*

#### II.1.1.3. Mantenimiento de las células

Las células se conservaron en punciones en medio sólido compuesto por extracto de levadura al 0.3% y DIFCO-BACTOAGAR al 1.5%, o en tubos de 10 ml con medio RCV con  $\text{KNO}_3$  o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno. En ambos casos las células se mantuvieron iluminadas a 4°C. Las punciones se renovaron cada 3 meses y los inóculos en medio líquido cada mes.

#### II.1.1.4. Pureza de los cultivos

Se determinó rutinariamente mediante la toma de muestras de los cultivos, en condiciones estériles, y posterior extensión de las mismas sobre el medio sólido descrito anteriormente.

#### II.1.2. *Recogida de células*

Las células se recogieron por centrifugación a 4°C y 20 000 g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada RC2-B de SORVALL, se lavaron con tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7.5, o con tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7.0, cuando se iba a determinar la actividad GS, y finalmente se resuspendieron en uno de los tampones, a razón de 10 ml por gramo de peso fresco de células.

## II.2. ENZIMAS

### II.2.1. *Preparación de extractos acelulares*

En la preparación de extractos de *R. capsulata* E1F1 se utilizaron, según los casos, dos métodos de rotura: choque osmótico, para el estudio de las actividades nitrato y nitrito reductasas, y tratamiento con ultrasonidos, para el estudio de la glutamina sintetasa.

#### II.2.1.1. Rotura por choque osmótico

A la suspensión de células en el tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7.5 ( 1 g peso fresco / 10 ml tampón ), se le añadió glicérol 11.62 M hasta una concentración final de 3 M. Esta solución se añadió gota a gota, con agitación, a un volumen diez veces mayor de TRIS-HCl 50 mM, pH 7.5, al que se adicionaron 5 mg de DNasa. La suspensión resultante se centrifugó a 10 000 *g* durante 15 minutos. El precipitado, que contenía las membranas, se resuspendió en el tampón anterior y se utilizó para los ensayos de la nitrato y nitrito reductasas.

#### II.2.1.2. Rotura por ultrasonidos

Las células se resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7.0 ( 1 g peso fresco / 10 ml tampón ) y se rompieron por tratamiento con ultrasonidos a 0°C ( nueve periodos de 20 s a 90 W ) en un sonicador BRANSON modelo B-12. El extracto obtenido se centrifugó a 36 000 *g* durante 15 minutos y el sobrena-

dante se utilizó para el ensayo de la GS. En los casos en que se indica este extracto se centrifugó 1 hora a 100 000 g en una ultracentrífuga refrigerada BECKMAN SPINCO L2 65B, usando un rotor de receptáculos fijos tipo 30.

#### II.2.2. *Determinación de actividades enzimáticas de R. capsulata E1F1*

Las actividades enzimáticas se determinaron *in situ*, utilizando suspensiones de células permeabilizadas, o *in vitro*, con extractos acelulares. El primer tipo de determinaciones se empleó rutinariamente debido a su rapidez y fiabilidad, ya que se realiza en células enteras, mientras que el sistema *in vitro* está sujeto a diversas manipulaciones para romper las células y extraer la enzima. Por tanto, este último tipo de ensayo se utilizó en experimentos en los que no era crítica la rapidez de la medida.

La permeabilización de las células se llevó a cabo de cualquiera de las dos formas siguientes:

1) con MTA : por cada mililitro de suspensión celular se añadieron 10 µl de una solución de MTA al 5% y se agitó fuertemente durante un minuto.

2) con tolueno : se añadieron 20 µl de tolueno por mililitro de la suspensión celular correspondiente y se agitó fuertemente durante dos minutos.

Las unidades de actividad se definen para cada enzima y la actividad específica se expresa como unidades por miligra

mo de proteína.

#### II.2.2.1. Actividad nitrato reductasa

Se ensayó como se ha descrito previamente (Paneque *et al.* 1965), con metil viológeno reducido químicamente con ditionito como donador de electrones, midiendo colorimétricamente el nitrito formado en la reacción enzimática. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ moles de tampón TRIS-HCl, pH 8.0; 0.2  $\mu$ moles de metil viológeno; 10  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_3$ ; 0.8 mg de ditionito sódico disueltos en 0.1 ml de TRIS-HCl 0.5 M, pH 8.0, y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se llevó a cabo a 30°C y se detuvo por agitación enérgica, para oxidar el ditionito.

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1  $\mu$ mol de nitrato a nitrito por minuto.

#### II.2.2.2. Actividad nitrito reductasa

Se determinó siguiendo el método descrito por Ramírez *et al.* (1966), con metil viológeno reducido químicamente con ditionito como donador de electrones, midiendo colorimétricamente el nitrito desaparecido. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ moles de tampón fosfato, pH 7.0; 0.2  $\mu$ moles de metil viológeno; 2  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_2$ ; 2.66 mg de ditionito sódico disueltos en 0.1 ml  $\text{NaHCO}_3$  0.29 M, y una cantidad adecuada de enzima. Se llevó a cabo la reacción a 30°C

y se detuvo por agitación enérgica. Para la determinación del nitrito fue preciso diluir la mezcla de ensayo convenientemente, debido a la sensibilidad del método de determinación.

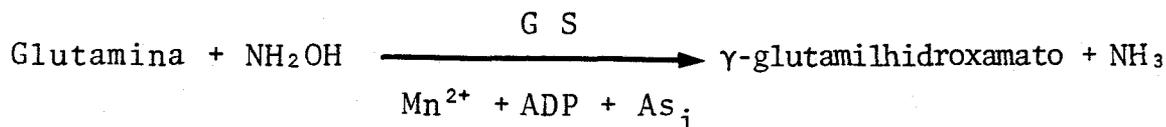
Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1  $\mu\text{mol}$  de nitrito a amonio por minuto.

### II.2.2.3. Actividad glutamina sintetasa

Se determinó mediante dos ensayos diferentes, uno colorimétrico ( actividad transferasa ) y otro espectrofotométrico ( actividad biosintética ). El primero se utilizó con células permeabilizadas, extractos acelulares y enzima purificada, y el segundo sólo con enzima purificada.

#### II.2.2.3.1. Actividad transferasa

Se determinó mediante el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970), midiendo a 500 nm el  $\gamma$ -glutamilhidroxamato formado en la reacción



La reacción se llevó a cabo a 30°C y en 1 ml de volumen final, que contenía: 50  $\mu\text{moles}$  de tampón MOPS, pH 7.0; 30  $\mu\text{moles}$  de L-glutamina; 3  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.4  $\mu\text{moles}$  de ADP; 60  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; 20  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  y la cantidad adecuada de células permeabilizadas, extracto acelular o enzima purificada. En esta mezcla se midió la actividad transferasa total

( de la enzima adenilada y desadenilada ). Para medir la actividad de la enzima desadenilada se añadieron a la mezcla de reacción anterior 60  $\mu$ moles de  $MgCl_2$  (Stadtman y Ginsburg 1974). La reacción se inició al añadir el arseniato y se detuvo añadiendo 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido que se describe en el apartado II.3.3 .

El grado de adenilación de la GS se determinó por la fórmula

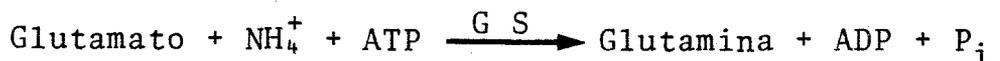
$$\bar{n} = 12 \left( 1 - \frac{\text{actividad transferasa} + 60 \text{ mM } MgCl_2}{\text{actividad transferasa} - MgCl_2} \right)$$

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato por minuto.

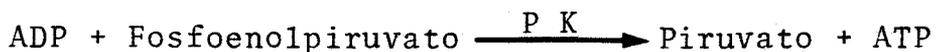
#### II.2.2.3.2. Actividad biosintética

Se siguió el procedimiento descrito por Stewart y Rhodes (1977), acoplando la formación de ADP con la oxidación de NADH via piruvato kinasa (PK), fosfoenolpiruvato y lactato deshidrogenasa (LDH), según las siguientes reacciones:

- reacción básica



- reacciones acopladas



En 1 ml de volumen final la mezcla de reacción contenía: 50  $\mu$ moles de tampón MOPS, pH 7.0; 100  $\mu$ moles de  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ ;

100  $\mu$ moles de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 12  $\mu$ moles de ATP; 1  $\mu$ mol de fosfoenolpiruvato; 50  $\mu$ moles de KCl; 40  $\mu$ moles de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 100  $\mu$ moles de glutamato monosódico; 0.2  $\mu$ moles de NADH; piruvato kinasa (12 U); lactato deshidrogenasa (5 U), y la cantidad adecuada de enzima purificada. La reacción se siguió espectrofotométricamente, por la disminución de la absorbencia a 340 nm, y se llevó a cabo a temperatura ambiente, dando comienzo al añadir el glutamato.

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1  $\mu$ mol de NADH por minuto, en las condiciones experimentales que se han descrito.

#### II.2.2.4. Actividad dinitrogenasa

Se determinó midiendo la reducción de acetileno a etileno por células enteras, en atmósfera de argón, según el método descrito por Zumft y Castillo (1978), en vasijas de vidrio de 15 ml (conteniendo 3 ml de medio de cultivo con células) colocadas en un aparato de WARBURG con iluminación ( $4 \text{ W m}^{-2}$ ) y ligera agitación, a una temperatura constante de  $30^\circ\text{C}$ . La reacción se inició al añadir 1 ml de acetileno puro, tomándose a intervalos fijos de tiempo, muestras gaseosas de 100  $\mu$ l, en las que se determinó el etileno formado mediante la cromatografía de gases en una columna de PORAPAK N.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1  $\mu$ mol de acetileno por minuto.

### II.2.3. *Determinación de actividades enzimáticas de proteínas usadas como patrones*

#### II.2.3.1. Actividad alcohol deshidrogenasa

Se determinó espectrofotométricamente mediante la reducción de  $\text{NAD}^+$  por etanol, midiendo el incremento de absorción a 340 nm (Bergmeyer *et al.* 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 37.5  $\mu\text{moles}$  de tampón glicina-NaOH, pH 8.8; 126  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; 126  $\mu\text{moles}$  de clorhidrato de semicarbazida; 900  $\mu\text{moles}$  de etanol; 1.5  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NAD}^+$ , y la cantidad adecuada de enzima. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se inició con la adición del  $\text{NAD}^+$ .

#### II.2.3.2. Actividad catalasa

Se determinó midiendo la disminución de la absorbencia a 240 nm, que resulta de la descomposición enzimática del agua oxigenada (Lück 1963). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 45  $\mu\text{moles}$  de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 18  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y la cantidad adecuada de enzima. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se inició por la adición de la enzima.

## II.3. DETERMINACIONES ANALITICAS

### II.3.1. *Determinación de amonio*

Se determinó colorimétricamente a 410 nm después de añadir el reactivo de Nessler, según la técnica de microdifusión de Conway (1962). El  $\text{NH}_3$  se liberó de la muestra con 0.5 ml de una solución saturada de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y se fijó en 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01 N. Después de dos horas se tomaron 0.9 ml de la solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se añadió 0.1 ml de reactivo de Nessler ( solución A:  $\text{K}_2\text{HgI}_4$ ; solución B:  $\text{NaOH}$ , en proporción 1:1 ). La cantidad de amonio se calculó por comparación con una curva de calibrado obtenida con patrones en condiciones similares a las experimentales.

Para medidas rutinarias, el amonio se determinó diluyendo 1 ml de muestra centrifugada hasta un volumen de 5 ml, añadiendo 0.1 ml de reactivo de Nessler y midiendo la absorbencia a 410 nm.

### II.3.2. *Determinación de etileno*

Se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo PYE UNICAM serie 204 con un detector de ionización de llama y con un integrador PYE UNICAM DP-88 acoplado. Para obtener el tiempo de retención del etileno y calibrar el aparato, se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  del gas puro a 35°C y a la presión atmosférica, equivalentes a 4.09  $\mu\text{moles}$  de etileno. Para las determinaciones experimentales se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  de muestra gaseosa

y se compararon las áreas de los picos obtenidos al tiempo de retención correspondiente al etileno. En todas las operaciones se utilizaron microjeringas de precisión HAMILTON para gases.

### II.3.3. *Determinación de $\gamma$ -glutamihidroxamato*

Se determinó por reacción con  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido en las condiciones descritas por Shapiro y Stadtman (1970). El reactivo ácido de hierro incluía por litro: 33.33 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 7.73 ml de  $\text{HCl}$  12 N, y 60.24 ml de ácido tricloroacético al 20% (p/p). Se añadieron 2 ml de este reactivo a 1 ml de la solución problema y se determinó la absorbencia a 500 nm que presentaba el complejo formado ( $E_{1\text{M}}^{1\text{cm}} = 3\ 360$ ).

### II.3.4. *Determinación de nitrato*

Se determinó espectrofotométricamente a 210 nm, según el método descrito por Cawse (1967). A 1 ml de la solución que contenía la muestra se le añadió 1 ml de ácido sulfámico al 2% (p/v) para eliminar el nitrito presente. Al cabo de 2 minutos se añadieron 3 ml de ácido perclórico al 6.75% (v/v) y la solución se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasados los cuales se midió la absorbencia a 210 nm ( $E_{1\text{M}}^{1\text{cm}} = 1\ 400$ ).

### II.3.5. *Determinación de nitrito*

Se utilizó la reacción de diazotación de Griess - Ilosway, según el método descrito por Snell y Snell (1949). Se añadieron

1 ml de sulfanilamida al 1% (p/v) disuelta en HCl 2.5 N y 1 ml de N-naftiletildiamina al 0.02% (p/v) a 1 ml de la solución con nitrito. Se dejó desarrollar el color durante 10 minutos y se midió la absorbencia a 540 nm ( $E_{1M}^{1cm} = 54\ 500$ ).

#### II.3.6. *Determinación de proteína*

La cantidad de proteína se determinó generalmente según el método de Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones de Bailey (1967), que utiliza el reactivo de Folin y Ciocalteu después de una digestión alcalina en presencia de Cu(II). Para determinaciones más precisas, en muestras exentas de membranas y con menos de 25  $\mu$ g de proteína por mililitro, se utilizó el método colorimétrico descrito por Bradford (1976) con Azul de Coomassie. En ambos casos se utilizó seroalbúmina como proteína patrón. En el método de Lowry *et al.* se midió la absorbencia a 750 nm y en el de Bradford a 595 nm.

#### II.3.7. *Titulación de grupos -SH*

Se llevó a cabo midiendo el aumento de absorbencia a 255 nm debido al compuesto formado entre el pHMB y los residuos -SH de la proteína (Boyer 1954), siguiendo el método descrito por Cárdenas *et al.* (1976). Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y en condiciones anaeróbicas en cubetas de cuarzo provistas de tapón de goma. Una cantidad de pHMB exactamente pesada se disolvió hasta un volumen exacto en una mezcla 1:1 de NaOH 2 N y de un tampón fosfato 50 mM, pH 7.0, con 0.02% (p/v) de SDS. Se añadieron 10  $\mu$ l de esta solución a

2 ml del tampón con SDS en la cubeta de medida, e igual volumen del tampón fosfato-SDS sin pHMB a la cubeta de referencia. Tras hacer la anaerobiosis en las cubetas, se ajustó la absorbencia a 255 nm en 0, y a intervalos de 10 a 15 minutos, se añadieron, en ambas cubetas, alícuotas con cantidades conocidas de la enzima, midiéndose el incremento de la absorbencia que se producía. El proceso se siguió hasta que nuevas adiciones de enzima no provocaban aumento en la absorbencia corregida para eliminar el efecto de la dilución.

#### II.3.8. *Medida del crecimiento celular*

El crecimiento de las células se siguió turbidimétricamente midiendo a 680 nm la absorbencia de los cultivos.

### II.4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### II.4.1. *Centrifugación en gradiente de viscosidad*

Se utilizó para determinar el coeficiente de sedimentación de la glutamina sintetasa, siguiendo el método descrito por Martin y Ames (1961). Se empleó una ultracentrífuga refrigerada BECKMAN SPINCO L2 65B, con un rotor de receptáculos basculantes tipo SW 65K. Cada tubo de centrifuga contenía 4.3 ml de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20% (p/v), desde el menisco hasta el fondo, preparado en un tampón MOPS 50 mM, pH 7.0, que incluía DTE 0.5 mM, EDTA 0.5 mM y MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM. El gradiente se formó con un mezclador BUCHLER (U.S.A.) de dos com

partimentos. Se aplicaron muestras de 0.1 ml conteniendo la glutamina sintetasa y/o las proteínas marcadoras y se centrifugaron a 100 000 *g* durante 6 horas. Acabada la centrifugación se sacaron los gradientes de los tubos a un flujo de 9 ml/h, empezando por el fondo del mismo, con un aparato DENSIFLOW de BUCHLER (U.S.A.), acoplado a una bomba peristáltica ULTRORAC modelo 7000 de LKB (Suecia), recogién dose fracciones de 2 gotas cada una.

Las proteínas marcadoras fueron: tiroglobulina (50  $\mu$ g), ferritina (50  $\mu$ g), catalasa (30  $\mu$ g), alcohol deshidrogenasa (50  $\mu$ g) y seroalbúmina bovina (80  $\mu$ g). La catalasa y la alcohol deshidrogenasa se detectaron por sus actividades enzimáticas, y la tiroglobulina, la ferritina y la seroalbúmina por sus absorbencias a 230 nm y, después de tratarlas con Azul de Coomassie (Bradford 1976), a 595 nm.

#### II.4.2. *Cromatografía de filtración en gel*

Se empleó para calcular el peso molecular y el radio de Stokes de la glutamina sintetasa, siguiendo el método descrito por Siegel y Monty (1966). Se utilizó una columna (2.5 x 36 cm) de Bio-Gel A-1.5 (100-200 mesh) equilibrada con tampón MOPS 50 mM, pH 7.0, que contenía DTE (0.5 mM), EDTA (0.1 mM) y MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM). En la parte superior del gel se depositaron muestras de 0.3 ml de GS y/o proteínas marcadoras, y glicerol al 6% (p/v) y se pasaron a través de la columna con un flujo de 30 ml/h, recogién dose fracciones de 1.3 ml cada una. La cromatografía se desarrolló en una cámara climatizada a una

temperatura entre 0 y 4°C. El volumen de elución ( $V_e$ ) de cada proteína se determinó localizándolas por alguno de los métodos descritos en la literatura. El volumen vacío o de exclusión ( $V_o$ ) se obtuvo como el volumen de elución de una muestra de azul dextrano al 0.3% (p/v) y el volumen total ( $V_t$ ) se determinó calibrando la columna vacía con agua.

Las proteínas marcadoras fueron: tiroglobulina (2 mg), ferritina (1 mg), aldolasa (5 mg), alcohol deshidrogenasa (5 mg), seroalbúmina (5 mg) y ovoalbúmina (5 mg). Todas se detectaron por su absorbencia a 230 nm o por su reacción coloreada con Azul de Coomassie (Bradford 1976), salvo la alcohol deshidrogenasa que se detectó por su actividad enzimática.

Para el tratamiento de los datos se utilizó la relación de Laurent y Killander (1964), representando  $(-\log K_{av})^{1/2}$  frente al radio de Stokes, siendo  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ .

#### II.4.3. *Cromatografía de afinidad*

Se utilizó en la purificación de la glutamina sintetasa, empleándose una columna cromatográfica (0.7 x 5.5 cm) rellena con 2',5'-ADP sefarosa 4B equilibrada en un tampón estándar (MOPS 50 mM, pH 7.0, con MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, DTE 0.5 mM y EDTA 0.1 mM). El extracto se pasó a través de la columna a un flujo de 18 ml/h. Para despegar las proteínas de la matriz se utilizó el mismo tampón pero se le añadió KCl (50 mM a 1 M) y/o ADP (3 a 10 mM), empleándose un flujo de 9 ml/h y recogiendo se fracciones de 2.3 ml. Todo el proceso se llevó a cabo en una cámara climatizada a 0 - 4°C. La localización de proteínas, y en

particular de la glutamina sintetasa, se realizó como se describe en los correspondientes apartados.

#### II.4.4. *Electroforesis*

##### II.4.4.1. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida

Las separaciones analíticas mediante electroforesis se llevaron a cabo en geles de acrilamida al 5% (p/v), según el método descrito por Jovin *et al.* (1964).

Los geles se polimerizaron a temperatura ambiente en cilindros de vidrio ( 0.5 x 10 cm ) y se prepararon mezclando 2 volúmenes de una solución de acrilamida al 20% (p/v) y bis-acrilamida al 0.8% (p/v), 1 volumen de tampón TRIS-HCl 3M, pH 8.8, que contenía TEMED al 0.46% (v/v), 1 volumen de agua destilada y 4 volúmenes de una solución de persulfato amónico al 0.07% (p/v), preparada inmediatamente antes de su uso. Los tubos se llenaron hasta 2 cm de su extremo superior, aproximadamente, cubriéndose el menisco con una capa de agua destilada para evitar el contacto con el aire.

Como tampón electrolito se usó una solución de pH 8.3, que contenía TRIS (3.6 g/l) y glicina (15.28 g/l). Las muestras ( 0.1 ml ) con 10 - 30  $\mu$ g de proteína, glicerol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0.1% (v/v), que se usó como marcador del frente de la electroforesis, se colocaron en la parte superior del gel y se sometieron a una corriente continua de 1.5 mA/gel durante los primeros 15 minutos y de 3 - 4 mA/gel hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior del tubo (1.5-2h).

Para determinar el peso molecular de la GS mediante electroforesis se utilizó el procedimiento descrito por Hedrick y Smith (1968), con geles de distinto grado de polimerización (3.5, 5, 6.25 y 7.5%). Como proteínas patrones se usaron: tiroglobulina, ferritina, catalasa, lactato deshidrogenasa y seroalbúmina, de un KIT suministrado por PHARMACIA (Suecia). Las proteínas se disolvieron en 0.1 ml de tampón electrolito y se tomaron muestras de 5  $\mu$ l que se diluyeron a 0.1 ml con tampón electrolito que contenía glicerol y azul de bromofenol a las concentraciones dadas anteriormente.

#### II.4.4.2. Tinción de proteína

Las bandas de proteína se localizaron sobre los geles, una vez finalizada la electroforesis, por tinción con una solución de Azul de Coomassie al 1% (p/v) en ácido acético al 7% (v/v). Tras 1 - 2 horas de tinción se lavaron los geles varias veces con una mezcla de metanol al 5% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v).

En otras ocasiones los geles se tiñeron con el reactivo descrito por Bradford (1976) para la determinación de proteínas. Los geles se conservaron en una solución de ácido acético al 7% (v/v), después de lavarlos con agua.

#### II.4.4.3. Detección de la actividad glutamina sintetasa

Se detectó mediante la actividad transferasa de la GS, según el método descrito por Lepo *et al.* (1979). Los geles se introdujeron en la mezcla de reacción descrita para el ensayo

de la actividad transferasa a 30°C durante 30 minutos. A continuación se pasaron al revelador de FeCl<sub>3</sub>-tricloroacético, apareciendo bandas de color marrón-rojizo, debidas al hidroxamato férrico, donde había actividad GS. Estas bandas se difuminaban y desaparecían completamente antes de una hora, por lo que se marcaban atravesando el gel con un hilo de cobre.

#### II.4.4.4. Densitogramas

Los densitogramas de los geles de poliacrilamida se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 8-100 equipado con un densitómetro 790826.

Se midió la absorbencia a 640 nm a lo largo de los geles teñidos para proteína, colocados en tubos de vidrio de 0.5 cm de diámetro interno, a una velocidad de 0.4 mm/s. Los intervalos de absorbencia fueron de 0 a 2 unidades, con una rendija horizontal de 2 mm y una rendija vertical derecha de 0.5 mm para el haz de medida y un atenuador para el haz de referencia.

#### II.4.5. *Métodos inmunológicos*

##### II.4.5.1. Doble inmunodifusión

Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ouchterlony y Nilsson (1978) con ligeras modificaciones. Se añadieron 3 ml de una solución de agar al 1% (p/v) en tampón fosfato salino (P B S), fundidos a una temperatura superior a 56°C, sobre una placa de vidrio ( 75 x 25 mm ) y se dejó solidificar,

conservándola en un ambiente húmedo hasta su uso. Las muestras se depositaron en pocillos circulares efectuados con una plantilla, y se dejaron difundir durante 36 horas, pasadas las cuales se lavaron 1-2 días con PBS para eliminar posibles proteínas no precipitadas, y posteriormente con agua destilada para eliminar las sales del tampón. Por último, se tiñeron para proteína o para actividad GS y se dejaron secar a temperatura ambiente. La solución de PBS estaba compuesta por fosfato potásico 50 mM y NaCl 150 mM, a pH 7.2, ajustado con KOH. Como preservante se añadió además  $\text{NaN}_3$  al 0.02% (p/v).

#### II.4.5.2. Inmunoelectroforesis cruzada

Se realizó de acuerdo con Weeke (1973b) y consistió en una primera electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TRIS (25 mM) - glicina (0.2 M) de pH 8.5, seguida de otra en dirección perpendicular, en otro gel de agarosa que contenía además anticuerpos anti-GS.

Las electroforesis se realizaron a 4°C utilizando como electrolito el tampón TRIS-glicina anterior. Se aplicó una corriente de 10 V/cm (250 V de salida del alimentador), estando la agarosa (10 ml) extendida sobre placas de vidrio (91 x 83 mm) y empleándose como puente entre éstas y el tampón, papel WHATMAN n°1 empapado en dicho tampón. El tiempo de desarrollo de la primera electroforesis fué de 90 - 105 minutos. Al finalizar ésta, se cortó la banda de gel en la que se habían distribuido los antígenos y se colocó en el extremo de otra placa, que se cubrió con la mezcla de agarosa y de anticuerpos.

El tiempo de la segunda electroforesis fue de 4 - 5 horas, en las mismas condiciones que la primera. Las placas se lavaron durante un día con PBS y luego una hora con agua destilada, tiñéndose para actividad o proteína.

#### II.4.5.3. Inmunoelectroforesis cuantitativa de cohete

Se desarrolló de acuerdo con Weeke (1973a) en placas de vidrio ( 91 x 83 mm ) cubiertas con agarosa al 1% en el tampón TRIS-glicina de pH 8.6 descrito en el apartado anterior, conteniendo además anticuerpos anti-GS. Las preparaciones de antígeno se depositaron en pocillos efectuados en uno de los extremos de la placa, desarrollándose la electroforesis en condiciones idénticas a las descritas anteriormente. El lavado y la tinción de los geles se realizó también como se describe en el anterior apartado.

#### II.4.5.4. Tinción de proteína

La disolución reveladora estaba formada por Azul de Coomassie al 0.05% (p/v) en ácido acético al 10% (v/v) e isopropanol al 25% (v/v). Las placas se dejaron en esta solución 2 horas a temperatura ambiente y luego se mantuvieron 8 horas en una mezcla de ácido acético al 10% (v/v) e isopropanol al 10% (v/v) para eliminar la tinción de fondo. Por último se tuvieron una noche en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### II.4.5.5. Tinción de actividad glutamina sintetasa

Los geles, lavados con PBS y agua, se incubaron en la mezcla de ensayo para la actividad transferasa durante 30 minutos a 30°C. A continuación se introdujeron en el revelador de hierro en medio ácido, descrito en el apartado II.3.3. , observándose la aparición de las bandas de hidroxamato férrico donde había actividad GS. Era necesario realizar las fotografías rápidamente, ya que el color marrón-rojizo se iba difuminando hasta desaparecer con el tiempo.

#### II.4.6. *Determinaciones espectrofotométricas*

Tanto para las determinaciones colorimétricas como para las de cinética enzimática se empleó un espectrofotómetro PYE UNICAM de doble haz, modelo SP 8-100, con lectura digital y regulador de velocidad incorporado. Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso de luz con una capacidad de 163 ml, de cuarzo para longitudes de onda inferiores a 340 nm. La anchura de banda utilizada fué de 1 nm en todos los casos, salvo para la obtención de los densitogramas, cuyas condiciones se detallan en el apartado II.4.3.4. Todas las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

#### II.4.7. *Diálisis de sales y moléculas pequeñas*

Cuando fué preciso eliminar sales y otras moléculas de pequeño tamaño, las soluciones enzimáticas se dializaron en bolsas de celulosa regenerada VISKING (Serva, R.F.A.), previamente

hervidas en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$  al 1% (p/v) y EDTA al 0.01% (p/v) durante 30 minutos y lavadas posteriormente con abundante agua destilada.

## II.5. REACTIVOS Y APARATOS

### II.5.1. *Procedencia de los reactivos utilizados*

El agua destilada, que se utilizó para preparar disoluciones y lavar el material de laboratorio, se obtuvo en un destilador de vidrio DRA. En los casos en que la destilación no era crítica se empleó agua desionizada proporcionada por un desmineralizador SETA.

Los gases utilizados ( argon, dinitrógeno y acetileno ) fueron suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno S.A. (Sevilla).

Los siguientes productos fueron adquiridos a la casa SIGMA (St. Louis, U.S.A.): ADH, ADP, ATP, L-aminoácidos, antimicina A, Azul de Coomassie, catalasa, DNasa, DTE, FAD, FMN, HEPES, pHMB, HQNO, LDH, MES, MOPS, MSX, MTA, PEP, PK, riboflavina, sacarosa, TEMED, TRIS y TRITON X-100 .

De SERVA (Heidelberg, R.F.A.) procedían: azul dextrano, BV, clorhidrato del pirofosfato de tiamina, ferritina, MV, ovoalbúmina, persulfato y seroalbúmina.

De BOEHRINGER (Manheim, R.F.A.): citocromo *c*,  $\text{NAD}^+$ , NADH y NADPH. Las proteínas marcadoras para la electroforesis y para la filtración en gel, así como la 2',5'-ADP sefarosa 4B ,

procedían de PHARMACIA (Uppsala, Suecia). La azida, el cianato y el molibdato fueron de CARLO ERBA (Milán, Italia). El bacto-agar y el extracto de levadura eran de DIFCO (Detroit, U.S.A.). De RIEDEL (Hannover, R.F.A.) el EDTA y el glicerol. El Bio-Gel fué suministrado por BIO-RAD (Richmond, U.S.A.). La acrilamida era de BDH (Poole, Inglaterra) y la bis-acrilamida de ALDRICH (Beerse, Bélgica).

La ferredoxina de *Clostridium pasteurianum* fué cedida por el Dr. J. Cárdenas y la de *Anabaena* sp. 7119, así como la NADPRasa de esta misma cianobacteria, lo fueron por D. Aurelio Serrano, de nuestro laboratorio. Los anticuerpos anti-GS de *R. capsulata* E1F1 fueron suministrados por el Dr. J.M. Rolán y por D. F. Romero, del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

Las sales empleadas en mayor cantidad en el medio de cultivo y en tampones ( fosfatos, carbonato e hidróxido sódico ), el sulfato de cobre y el ácido sulfúrico eran de la casa PANREAC (Barcelona). El resto de los productos utilizados eran de grado analítico y procedían de la casa MERCK (Darmstadt, R.F.A.).

### II.5.2. Aparatos

Las esterilizaciones de los medios y los recipientes se llevaron a cabo en un autoclave SELECTA, modelo P.

Para la congelación de las células se utilizó un congelador rápido WESTINGHOUSE.

Las pesadas se realizaron en una balanza METTLER modelo PB 3000 o en una balanza de precisión METTLER H16. Para pesadas más precisas se empleó una balanza METTLER M3.

Los ensayos a temperatura fija y los tratamientos térmicos se efectuaron en un baño termostato de SELECTA, modelo 157.

Las medidas de pH se efectuaron en un aparato BECKMAN modelo Expandomatic SS 2.

Las electroforesis analíticas se realizaron con un aparato SHANDON, con una fuente de alimentación de corriente continua VOKAM, modelo SE 2761 de SHANDON. Las inmunolectroforesis se desarrollaron en un equipo MULTIPHOR de LKB, modelo 2117, con una fuente de alimentación ATOM, modelo 500. El voltaje se midió sobre el propio gel utilizando un multímetro digital de SIMPSON, modelo 461.

### III. RESULTADOS

### III.1. CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES $\text{NO}_3$ Rasa, $\text{NO}_2$ Rasa Y GLUTAMINA SINTETASA DE CÉLULAS DE *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 CULTIVADAS EN CONDICIONES FOTOTRÓFICAS CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

La estirpe E1F1 de *R. capsulata* tuvo un crecimiento casi inapreciable cuando se cultivó en el medio RCV con  $\text{KNO}_3$  como única fuente de nitrógeno en aerobiosis y oscuridad, por lo que para estudiar las enzimas de la asimilación del nitrato, hasta formar glutamina, se emplearon condiciones fototróficas ( anaerobiosis - luz ).

#### III.1.1. *Métodos de permeabilización y rotura de células*

Los distintos métodos de permeabilización o rotura en ensayos determinaron la aparición o ausencia de las distintas actividades enzimáticas. Así, las actividades NR y NiR únicamente se pudieron detectar en extractos procedentes de células rotas por choque osmótico, mientras que la actividad GS se pudo ensayar en extractos obtenidos por todos los métodos ensayados (Tabla I).

#### III.1.2. *Niveles de crecimiento y actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato en distintas fuentes de nitrógeno*

Las células de *R. capsulata* E1F1 se cultivaron anaeró**u**bicamente en la luz utilizando fuentes de nitrógeno en diferen**u**

TABLA I

COMPARACION DE LOS METODOS DE PERMEABILIZACION Y ROTURA EMPLEADOS Y NIVELES ENZIMATICOS EN *R. capsulata* E1F1 .

Método empleado	Actividad enzimática ( % )		
	NO <sub>3</sub> Rasa	NO <sub>2</sub> Rasa	G S
Ultrasonidos	0	0	100
Prensa de French	0	0	99
Toluenización	0	0	93
Detergentes	0	0	95
Choque osmótico	100	100	92

Las células se cultivaron en condiciones fototróficas con KNO<sub>3</sub> y se recogieron y resuspendieron como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos se obtuvieron en las condiciones que se indican en la Tabla y en ellos se determinaron las actividades enzimáticas que se describen. El 100 % de actividad para NO<sub>3</sub>Rasa, NO<sub>2</sub>Rasa y GS fué de 25 mU/mg, 150 mU/mg y 4.1 U/mg, respectivamente.

tes estados de oxidación. La Tabla II muestra los niveles de crecimiento, tiempos de generación y actividades enzimáticas de la ruta de asimilación del nitrato.

Los mayores niveles de crecimiento se alcanzaron cuando el nitrógeno estaba incorporado a alguno de los aminoácidos estudiados, especialmente a la L-glutamina. Algo inferiores fueron los niveles de crecimiento en amonio, extracto de levadura y nitrato, y más bajos aún si la fuente de nitrógeno era nitrito o dinitrógeno.

Los tiempos de generación más bajos se obtuvieron con el extracto de levadura y con la L-glutamina, mientras que la duplicación se produjo más lentamente en medios con nitrito, y algo más rápida con dinitrógeno. Con el resto de las fuentes de nitrógeno empleadas los tiempos de generación oscilaron alrededor de las 3.5 horas.

La actividad nitrato reductasa sólo se detectó cuando en el medio de cultivo había nitrato o nitrito. Por el contrario, la actividad nitrito reductasa siempre estuvo presente, aunque su nivel de actividad se incrementó en medios con  $\text{NO}_3^-$  y más aún con  $\text{NO}_2^-$ . Este aumento no era apreciable si existía simultáneamente  $\text{NH}_4^+$  en el medio.

La actividad glutamina sintetasa se encontró también en todos los medios con las distintas fuentes de nitrógeno estudiadas. La actividad era mayor en los medios con L-glutamato, nitrito o nitrato, siempre que además no hubiese  $\text{NH}_4^+$ , siendo precisamente en medios con dicha fuente de nitrógeno donde se detectó la menor actividad de la enzima.

TABLA II

CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CELULAS DE *R. capsulata* E1F1 CULTIVADAS EN CONDICIONES FOTOTROFICAS CON DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO.

Fuente de nitrógeno	Absorbencia a 680 nm	Tiempo de generación ( h )	NO <sub>3</sub> Rasa (mU/mg)	NO <sub>2</sub> Rasa (mU/mg)	G S (U/mg)
N <sub>2</sub>	0.45	4.0	0	25	0.94
KNO <sub>3</sub>	1.28	3.5	19	39	1.66
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.35	3.5	2	25	0.39
NH <sub>4</sub> Cl	1.42	3.7	0	24	0.35
KNO <sub>2</sub>	0.69	4.5	23	51	1.93
L-glutamato	1.76	3.2	0	20	1.83
L-glutamina	1.98	2.5	0	26	0.69
L-alanina	1.55	3.5	0	18	0.76
Extracto de levadura	1.38	2.5	0	22	0.87

Las células se cultivaron fototróficamente en el medio RCV descrito en Materiales y Métodos con las fuentes de nitrógeno que se indican. A las 25 horas de cultivo se determinaron los diferentes parámetros como se describe en Materiales y Métodos. La actividad GS corresponde a la transferasa dependiente de Mn<sup>2+</sup> (total). Los tiempos de generación se calcularon a partir de los datos de crecimiento en los diferentes medios.

### III.1.3. *Crecimiento con nitrato, nitrito y amonio*

#### III.1.3.1. Niveles de actividad nitrato reductasa

En las Figs. 1A y 2A se muestran los perfiles de crecimiento de células de *R. capsulata* E1F1 en medios con y sin  $\text{NO}_3^-$  en ausencia (Fig.1) o presencia (Fig.2) de dinitrógeno disuelto. Las células crecieron siempre en los medios con nitrato, aunque el crecimiento fué menor en ausencia de dinitrógeno disuelto. En ausencia de nitrato sólo se observó crecimiento en presencia de  $\text{N}_2$  disuelto.

En las Figs.1B y 2B se presenta el consumo de nitrato y la excreción de nitrito al medio de cultivo, en ausencia o presencia de dinitrógeno, y con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno. En ambos casos se observó un consumo de  $\text{NO}_3^-$  durante la fase exponencial de crecimiento, acompañado de una excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio. El nitrato se consumió casi totalmente en presencia de  $\text{N}_2$  y sólo un 38% en ausencia de éste. La cinética de excreción de nitrito fué también diferente, alcanzándose valores 5 veces superiores en el medio sin dinitrógeno y consumiéndose en el medio con  $\text{N}_2$  conforme se iba agotando el nitrato.

Las actividades nitrato reductasas observadas en las condiciones de cultivo anteriores en las que tuvo lugar crecimiento, se muestran en la Fig.3. Los perfiles de actividad de los medios con nitrato son similares: un máximo de actividad que coincide con la fase de crecimiento exponencial, seguido de una caída al cesar el consumo de nitrato. En el medio que carecía de nitrato no se observó ninguna actividad nitrato re-

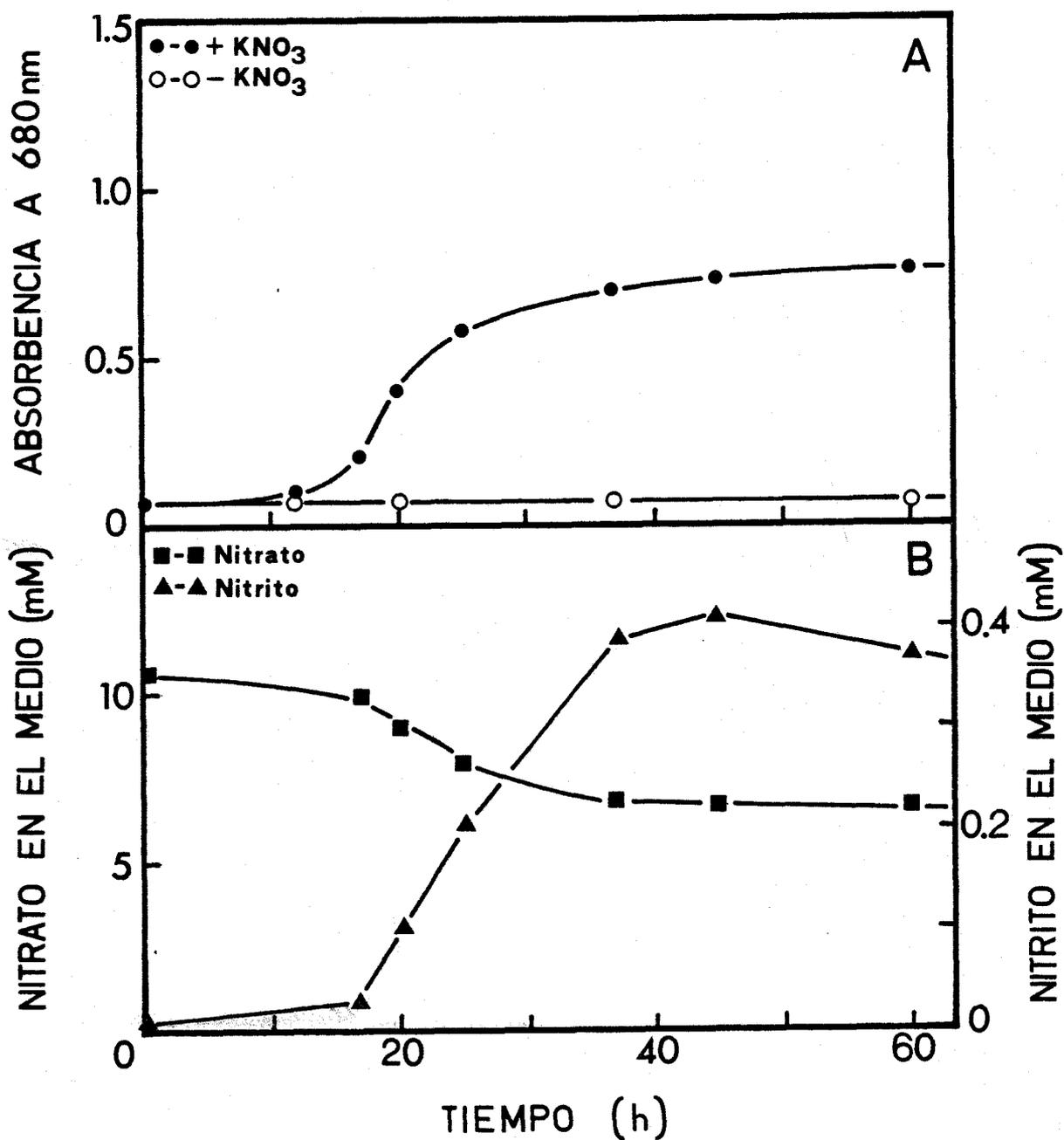


Figura 1.- Crecimiento, consumo de nitrato y excreción de nitrito al medio de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con y sin KNO<sub>3</sub> en atmósfera de argón.

Las células se cultivaron anaeróbicamente en la luz en el medio RCV burbujeado con Ar como se describe en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinaron los distintos parámetros por los procedimientos descritos en los correspondientes apartados.

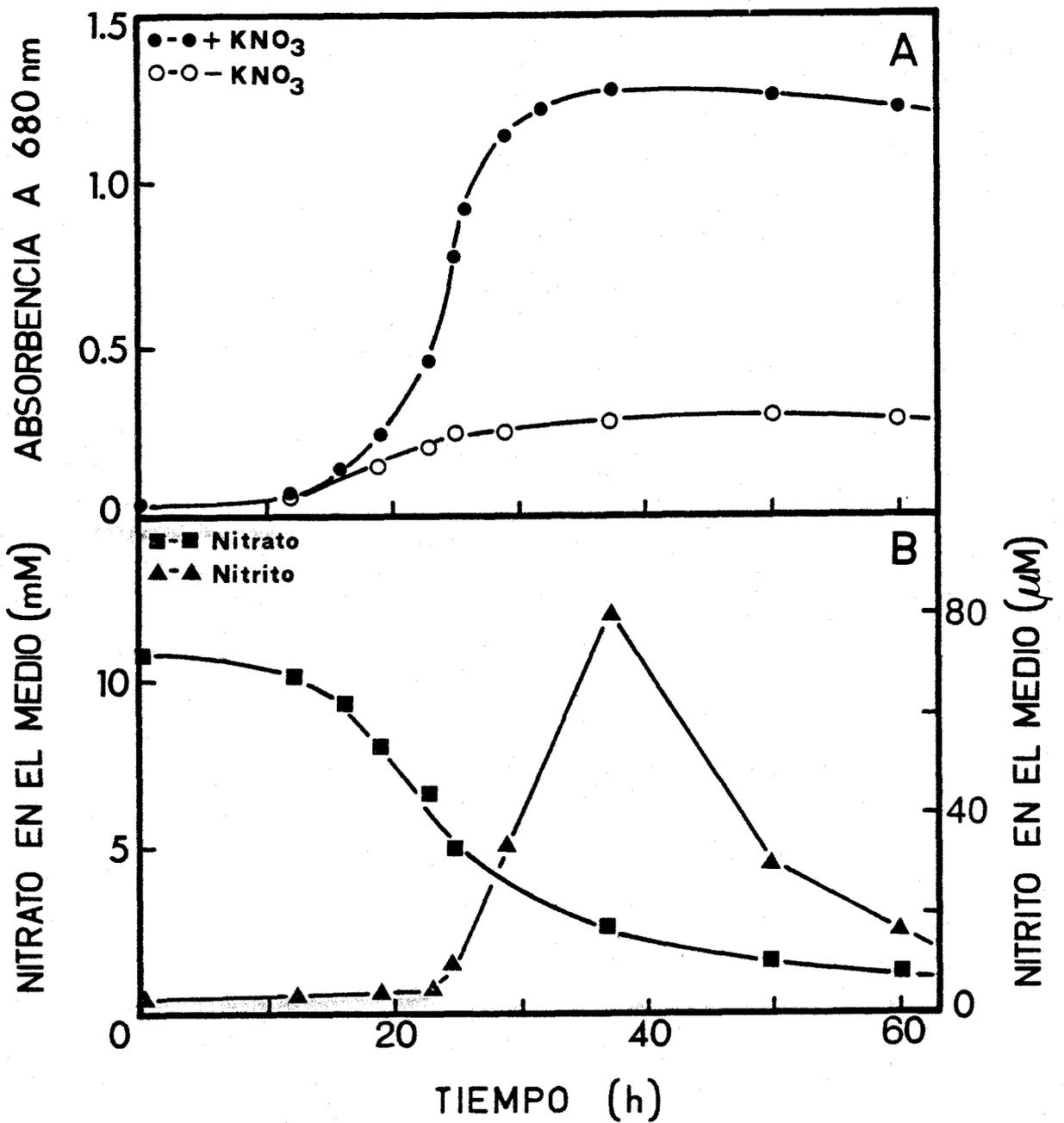


Figura 2.- Crecimiento, consumo de nitrato y excreción de nitrito al medio de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en condiciones fototróficas con y sin  $KNO_3$  en medios no burbujeados con argon

Las células se cultivaron en anaerobiosis en la luz y los distintos parámetros se determinaron como se detalla en los apartados correspondientes de Materiales y Métodos.

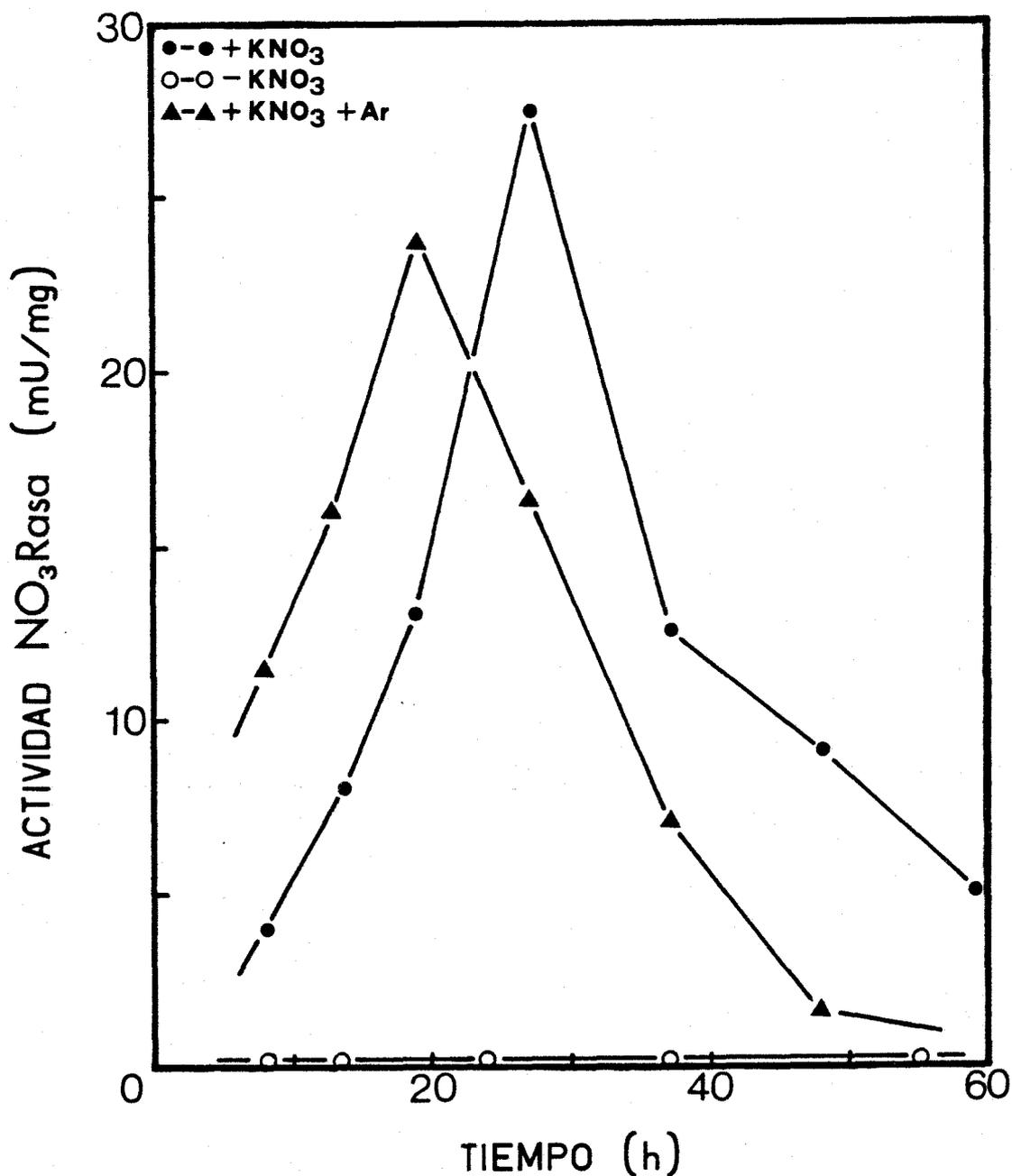


Figura 3.- Perfil de actividad nitrato reductasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente en medios con y sin  $KNO_3$ .

Las células se cultivaron anaeróbicamente en la luz en medios RCV burbujeados o no con argón. La actividad NR se determinó utilizando el ensayo colorimétrico descrito en Materiales y Métodos.

ductasa durante todo el crecimiento.

### III.1.3.2. Efecto sobre la actividad dinitrogenasa

La presencia de nitrato en el medio tuvo un efecto negativo sobre los niveles de actividad dinitrogenasa. Además, cuando el dinitrógeno se eliminó del medio de cultivo con nitrato, por desplazamiento con una corriente de argon, las células de *R. capsulata* E1F1 no mostraron actividad dinitrogenasa (Fig.4) .

### III.1.3.3. Niveles de actividad nitrito reductasa

Al añadir cantidades crecientes de  $\text{NO}_2^-$  a medios que tenían L-glutamato como fuente de nitrógeno, se produjo un aumento en el periodo de latencia de los cultivos, disminuyendo simultáneamente el nivel de crecimiento, hasta alcanzar valores nulos a concentraciones de nitrito de 10 mM (Fig.5). La actividad NR solamente se detectó en los medios a los que se añadió nitrito, y siempre con valores más bajos que los encontrados en medios con nitrito como única fuente de nitrógeno. Los niveles de actividad de la NiR también fueron inferiores a los obtenidos en medios con  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno, aunque se detectó actividad en todos los casos. Se observó además que había un consumo concomitante de nitrito durante el crecimiento exponencial (Resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos en medios de cultivo con  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno fueron parecidos a los anteriores, aunque los períodos de latencia eran mayores y la concen

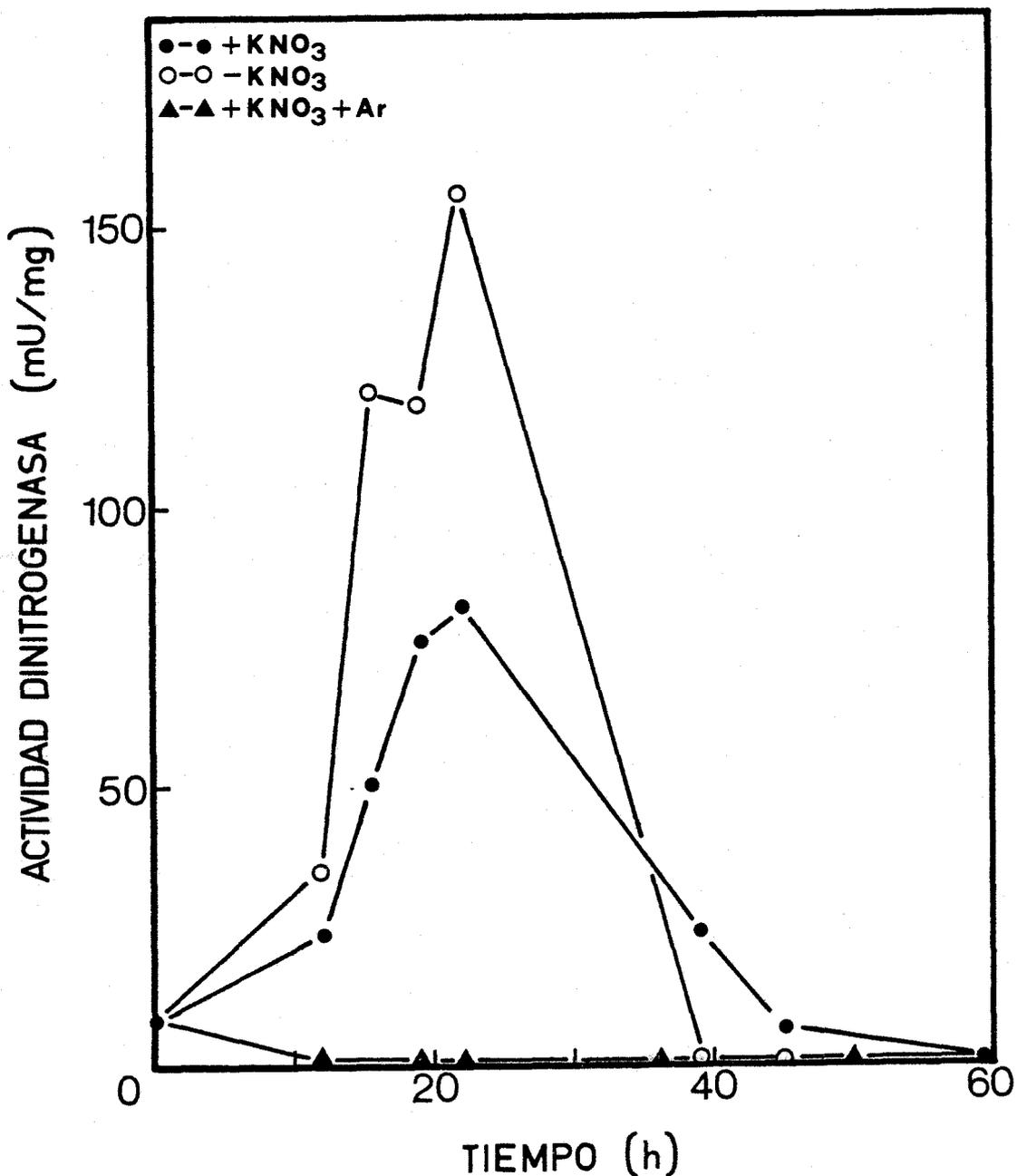


Figura 4.- Perfil de actividad dinitrogenasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas anaeróbicamente en la luz en medios con y sin  $KNO_3$ .

Las células se cultivaron fototróficamente en medios RCV con y sin atmósfera de argón como se describe en Materiales y Métodos. A los tiempos que se indican se determinó la actividad dinitrogenasa en células enteras según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

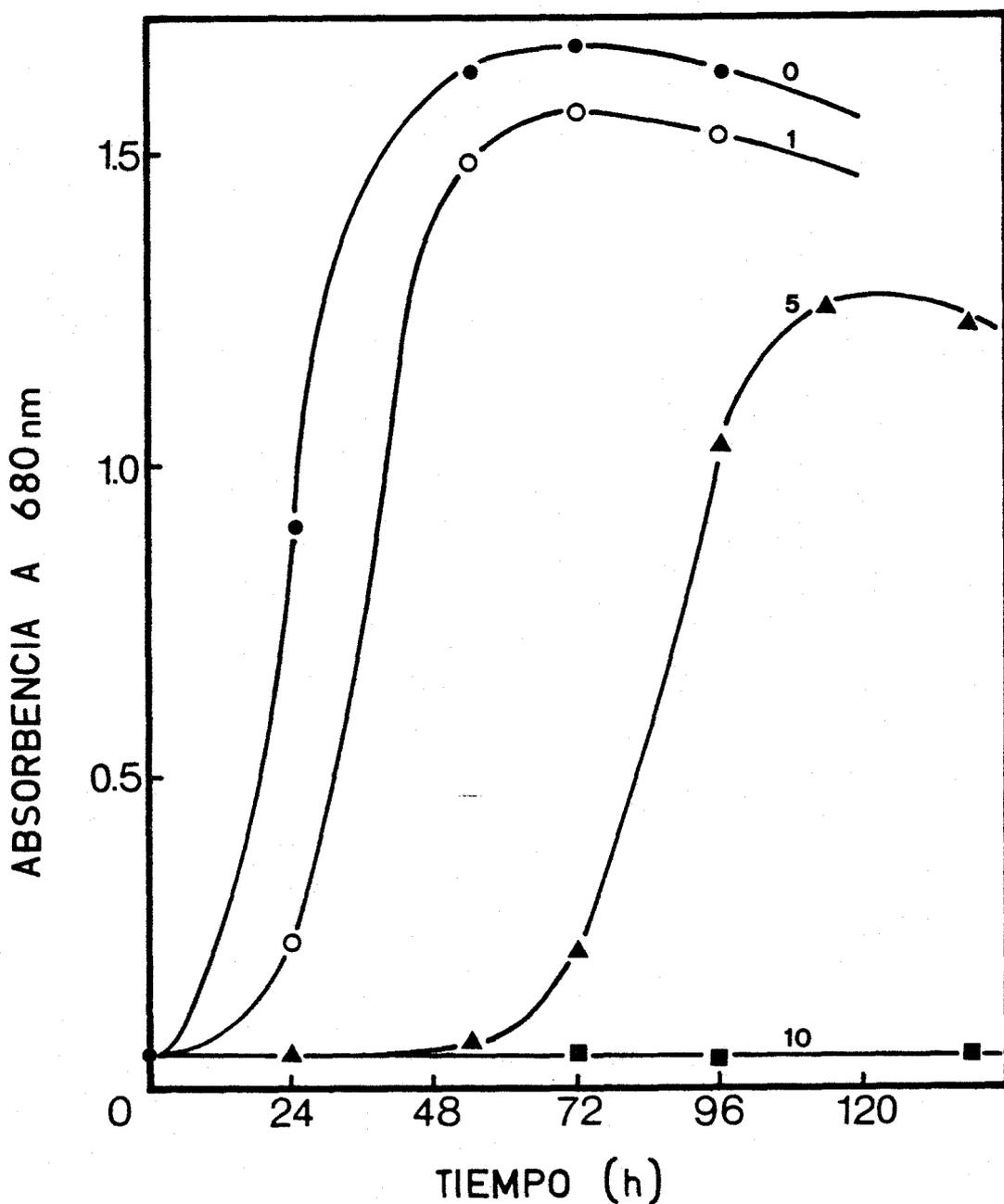


Figura 5.- Crecimiento de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con L-glutamato y diferentes concentraciones de nitrito.

Las condiciones de cultivo en el medio RCV se detallan en Materiales y Métodos. Todos los cultivos contenían inicialmente 1 g/l de L-glutamato y concentraciones de  $\text{KNO}_2$  desde 0 a 10 mM, como se indica en la figura.

tracción máxima de  $\text{NO}_2^-$  a la que se observó crecimiento fué de 3 mM, concentración a la cual las células de *R. capsulata* E1F1 permanecieron viables durante una semana antes de comenzar a crecer (Kerber *et al.* 1981) .

En las Figs.6A y B se presentan los perfiles de crecimiento y de la actividad NiR, respectivamente, de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en medios con  $\text{NO}_3^-$  (10 mM) o  $\text{NO}_2^-$  (1.5 mM) como única fuente de nitrógeno. No existieron diferencias sustanciales en el crecimiento entre ambas condiciones, con un perfil de actividad específica característico para esta enzima, con valores muy elevados en la fase de latencia que caían al iniciarse el crecimiento, para volver a aumentar hasta un máximo en la fase exponencial, disminuyendo otra vez en la fase estacionaria.

#### III.1.3.4. Niveles de actividad glutamina sintetasa

La actividad glutamina sintetasa se detectó en células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en todos los medios con las diferentes fuentes de nitrógeno estudiadas (Tabla II) .

En las Figs.7, 8 y 9 se presentan los perfiles de crecimiento y los de las actividades GS adenilada y total, de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en medios con nitrato, nitrato o amonio como únicas fuentes de nitrógeno. Los niveles más altos de actividad total se obtuvieron en el medio con nitrato, siendo en el de nitrato algo inferiores, pero siempre mayores que en el medio con amonio. En el apartado III.6.1. se estudiará la variación del grado de adenilación de la GS en re

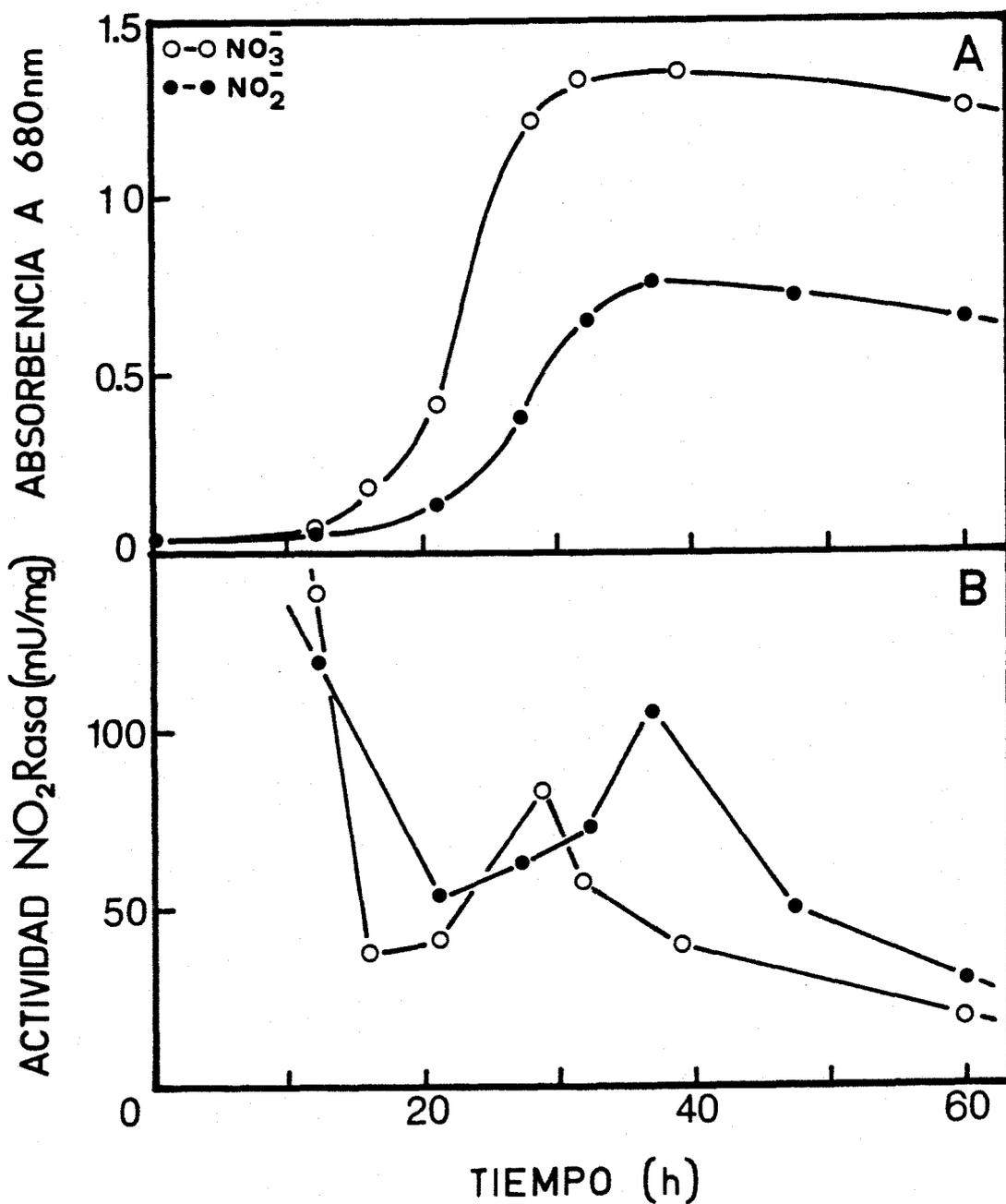


Figura 6.- Perfiles de crecimiento y de actividad nitrito reductasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$  y con  $KNO_2$ .

Las células se cultivaron en anaerobiosis en la luz en el medio RCV descrito en Materiales y Métodos con  $KNO_3$  10 mM o  $KNO_2$  1.5 mM como fuente de nitrógeno. A los tiempos que se indican se midió el crecimiento y la actividad NiR como se describe en Materiales y Métodos.

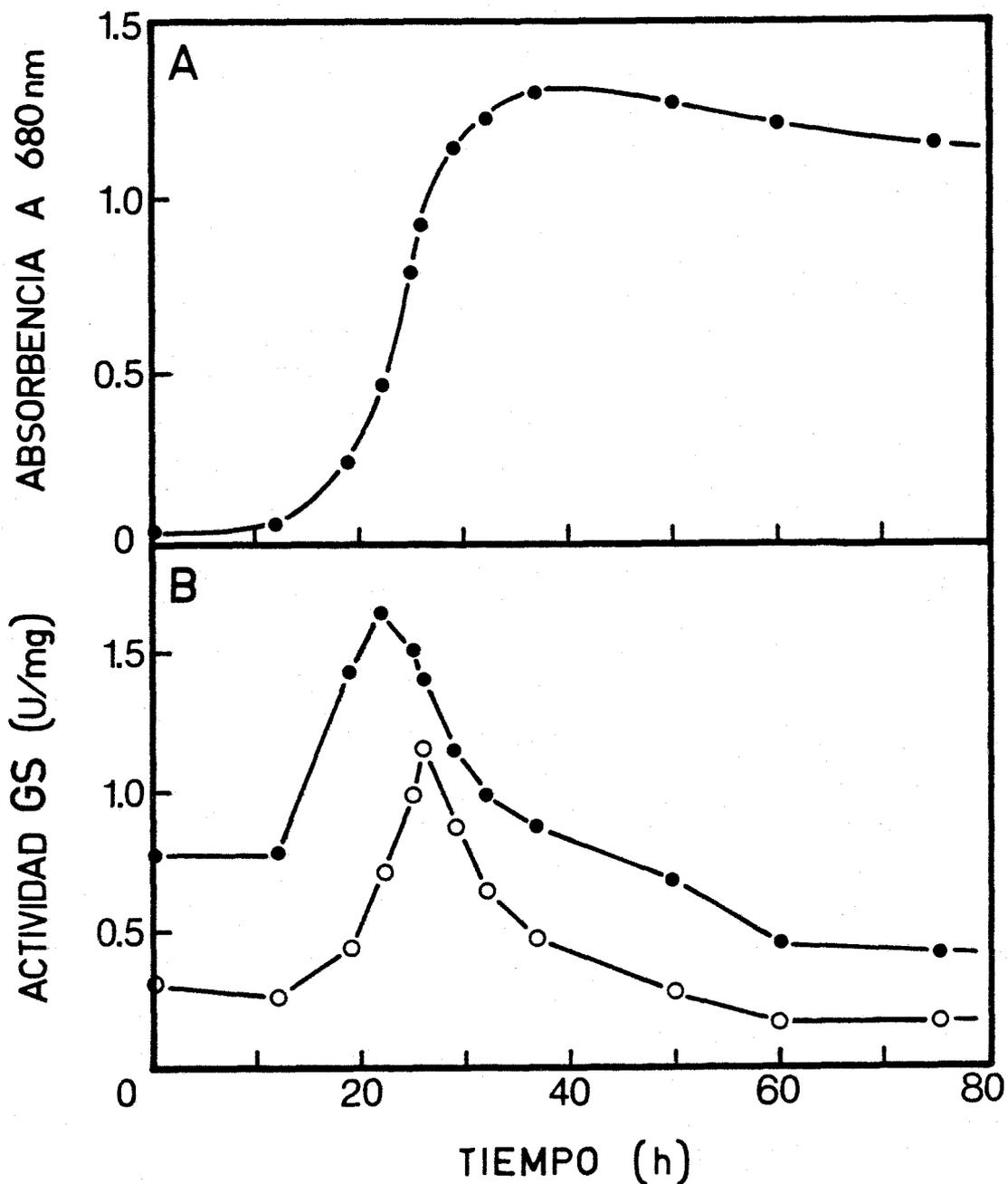


Figura 7.- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$ .

Las células se cultivaron en anaerobiosis en la luz en el medio RCV con  $KNO_3$  10 mM como fuente de nitrógeno. A diferentes intervalos de tiempo se determinó el crecimiento celular y las actividades transferasa de la GS, la dependiente de  $Mg^{2+}$  (○) y la dependiente de  $Mn^{2+}$  (●), como se detalla en Materiales y Métodos.

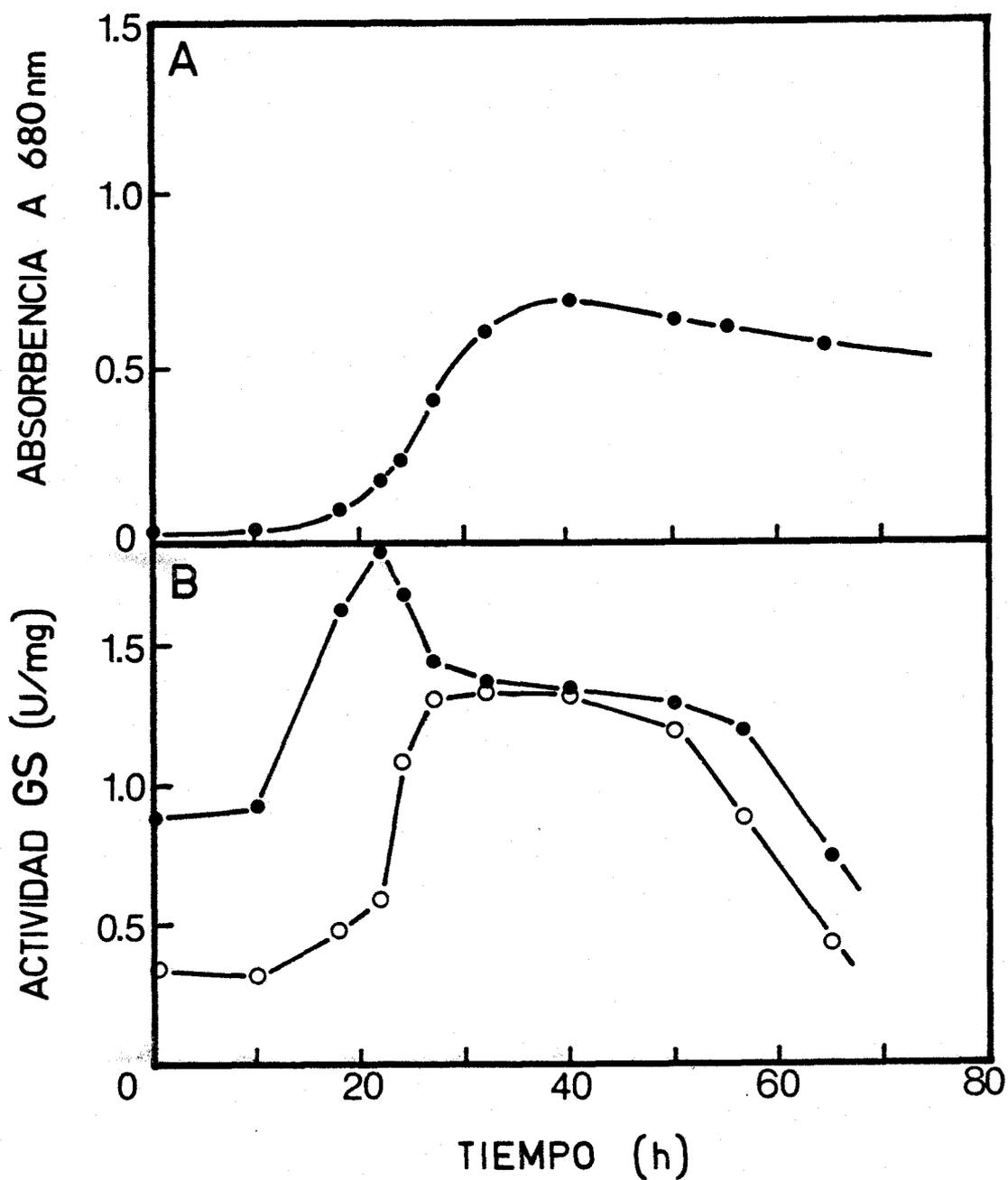


Figura 8.- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_2$ .

Las condiciones de cultivo son las mismas de la Fig.7, pero utilizando  $KNO_2$  1.5 mM como fuente de nitrógeno. Los distintos parámetros se determinaron como se especifica en Materiales y Métodos.

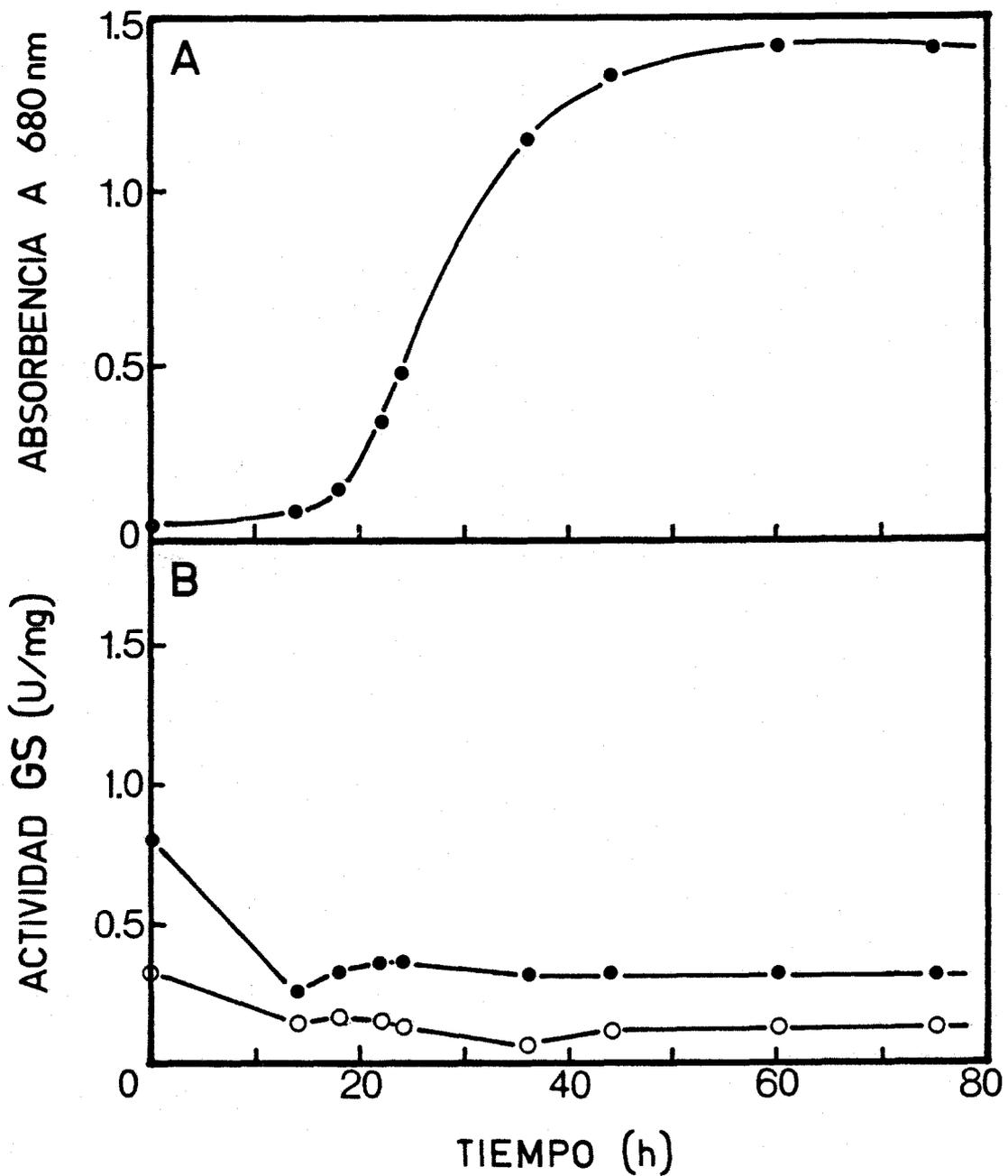


Figura 9.- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Las condiciones de cultivo son las de la Fig.7, salvo en la utilización de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/l como fuente de nitrógeno. La determinación del crecimiento y de las actividades GS se detallan en Materiales y Métodos.

lación con las distintas fuentes de nitrógeno empleadas y con la fase de crecimiento.

#### III.1.4. Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas

El medio R C V, descrito para el cultivo de bacterias de la especie *Rhodopseudomonas capsulata*, tiene un pH estándar de 6.8, aunque este no es el óptimo para el crecimiento de todas ellas. En las Figs.10 y 11 se muestran los perfiles de crecimiento y de las actividades enzimáticas implicadas en la reducción y asimilación del  $\text{NO}_3^-$  por células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno. Los medios R C V se habían ajustado previamente a pH 6.0, 7.0 y 8.0, respectivamente.

El crecimiento disminuyó sensiblemente en el medio de pH alcalino, siendo ligeramente mayor a pH debilmente ácido que en medio neutro (Fig.10A). La actividad NR fué mayor a pH 7.0 y con un perfil muy parecido al que se obtuvo a pH 8.0, mientras que a pH 6.0 se mantuvo a un nivel casi constante (Fig. 11A). La actividad NiR aumentó bastante con la alcalinidad del medio, llegando a ser a pH 8.0 tres veces mayor que a pH 6.0, y manteniéndose a un nivel intermedio en el cultivo de pH neutro (Fig.11B). La actividad GS, por el contrario, disminuyó al aumentar el pH del medio (Fig.10B).

Resultados similares se obtuvieron al ajustar el pH del medio a los mismos valores, pero utilizando  $\text{KNO}_2$  2 mM como fuente de nitrógeno, aunque a pH 6.0 no se observó crecimiento (Resultados no mostrados).

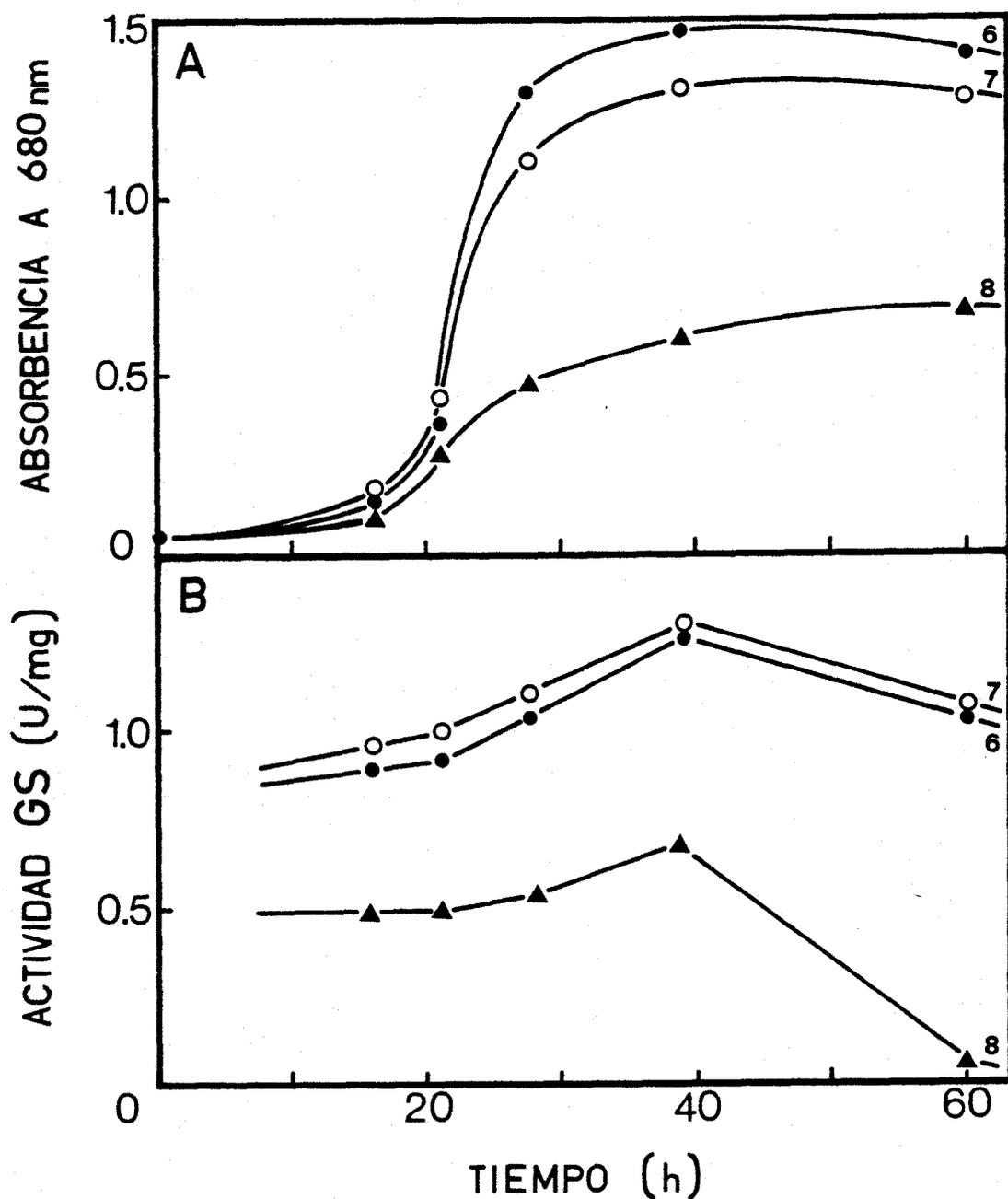


Figura 10.- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$  a distintos pH.

Se utilizó el medio RCV con  $KNO_3$  10 mM como fuente de nitrógeno, pero ajustando previamente su pH a los valores que se indican en la figura. A diferentes tiempos se determinó el crecimiento y la actividad transferasa total de la GS (dependiente de  $Mn^{2+}$ ).

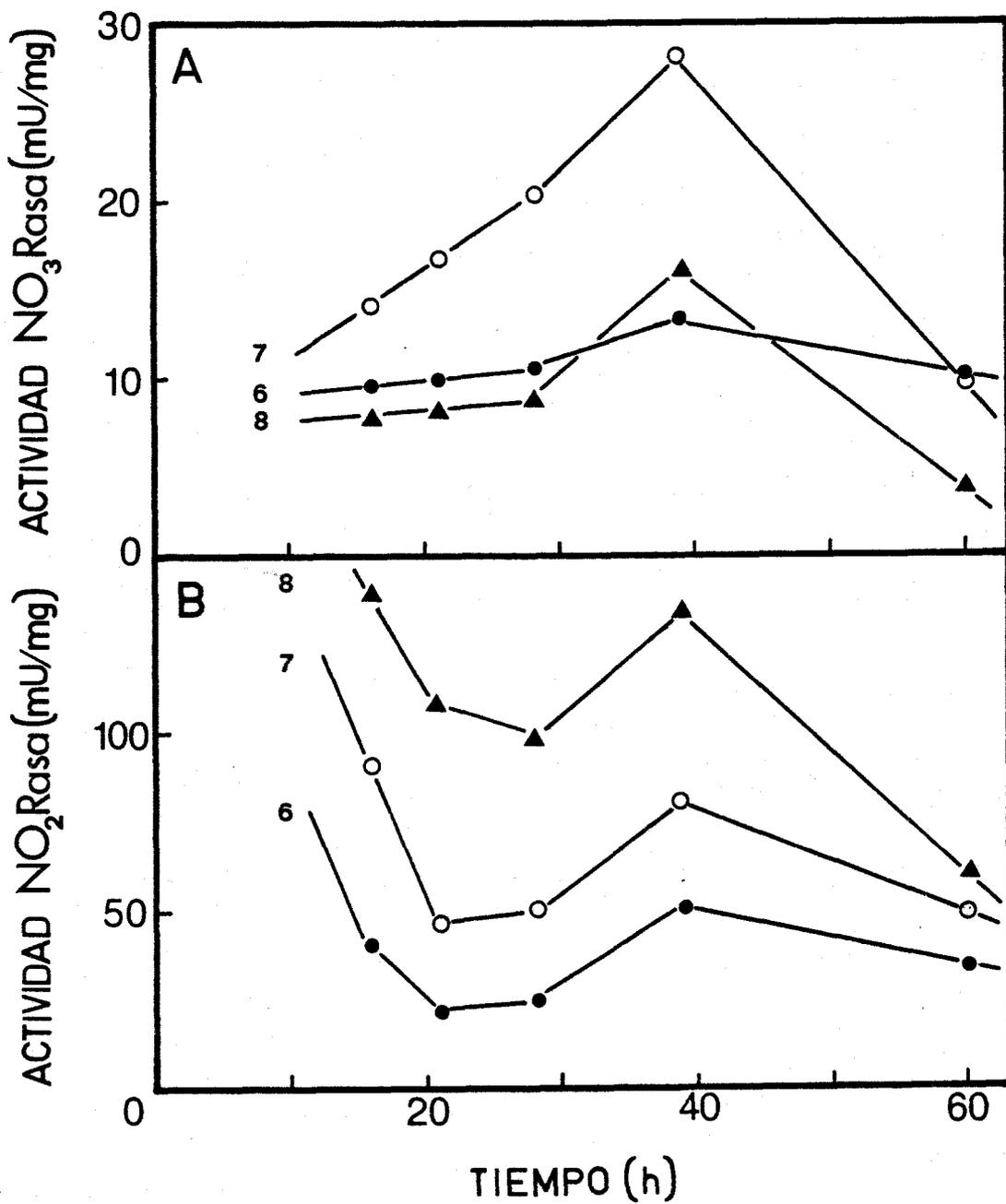


Figura 11.- Perfiles de las actividades nitrato y nitrito reductasas de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$  a distintos pH.

Las condiciones de cultivo son las mismas de la Fig.10. Las actividades NR y NiR se determinaron como se describe en Materiales y Métodos.

### III.2. CARACTERIZACIÓN *in situ* DEL SISTEMA DE REDUCCION ENZIMÁTICA DE NITRATO A NITRITO EN CELULAS DE *R. capsulata* E1F1

Dado que ninguno de los métodos ensayados para solubilizar las dos primeras enzimas de la ruta de asimilación del  $\text{NO}_3^-$  ( nitrato y nitrito reductasas ) resultó efectivo, se procedió a caracterizarlas *in situ*, permeabilizando las células mediante las técnicas descritas para hacer que dichas enzimas fueran accesibles a los reactivos del ensayo enzimático.

#### III.2.1. *Caracterización del ensayo de la actividad nitrato reductasa*

Para la caracterización *in situ* del ensayo de la reducción de nitrato catalizada por la nitrato reductasa de células de *R. capsulata* E1F1, se emplearon preparaciones obtenidas por choque osmótico y se utilizó metil viológeno reducido con ditionito como donador de electrones. Solamente tuvo lugar la reducción de nitrato cuando el sistema estaba completo (Tabla III). La preparación hervida fue totalmente inactiva.

La desaparición de  $\text{NO}_3^-$  fué estequiométrica con la formación de  $\text{NO}_2^-$  (Tabla IV).

#### III.2.1.1. Donadores de electrones e inhibidores

En la Tabla V se presentan los resultados obtenidos al ensayar diversos sistemas donadores de electrones para la reducción enzimática de nitrato *in situ* por extractos acelulares de

TABLA III

CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE REDUCCION ENZIMÁTICA DE  $\text{NO}_3^-$  A  $\text{NO}_2^-$  POR LA NITRATO REDUCTASA DE *R. capsulata* E1F1.

Sistema	Actividad $\text{NO}_3^-$ Rasa ( mU / mg )	Actividad relativa (%)
Completo	21	100
Menos nitrato	0	0
Menos metil viológeno	1	5
Menos ditionito	0	0
Completo, extracto hervido	0	0

El sistema completo incluía en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{moles}$  de tampón Tris-HCl, pH 8.0 ; 10  $\mu\text{moles}$  de  $\text{KNO}_3$  ; 0.2  $\mu\text{moles}$  de metil viológeno ; 4.6  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ; 10 mg de extracto enzimático. Se utilizaron preparaciones de membranas obtenidas por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA IV

ESTEQUIOMETRIA DE LA REDUCCION DE NITRATO Y DE LA FORMACION DE NITRITO CATALIZADA POR LA NITRATO REDUCTASA DE *R. capsulata* E1F1.

Tiempo (min)	Nitrato desaparecido ( nmol )	Nitrito formado ( nmol )	<u>Nitrato desaparecido</u> Nitrito formado
5	21.0	23.5	0.89
10	40.3	40.6	0.99
15	53.2	47.2	1.13

Se utilizó el ensayo estándar de nitrato reductasa, a 30°C, con metil viológeno reducido por ditionito. Se emplearon preparaciones enzimáticas con una actividad de 4.8 mU/mg ( 0.1 ml de ésta por ml de mezcla de ensayo). Al tiempo indicado en la Tabla se interrumpió la reacción enzimática y, en dos alícuotas, se determinaron el nitrato desaparecido y el nitrito formado, según se describe en Materiales y Métodos.

TABLA V

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES PARA LA REDUCCION ENZIMATICA DE NITRATO A NITRITO POR EXTRACTOS ACELULARES DE *R. capsulata* E1F1 .

Donador de electrones y cofactor	Concentración ( mM )	Actividad NO <sub>3</sub> Rasa ( unidades relativas )
S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	5	0
Metil viológeno / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.2/ 5	100
Bencil viológeno / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.2/ 5	30
FMN / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.1/ 5	1
FAD / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.1/ 5	0
Riboflavina / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.1/ 5	2
FMN / EDTA , luz	0.5/10	45
FAD / EDTA , luz	0.5/10	36
Riboflavina / EDTA , luz	0.5/10	41
NAD(P)H	0.3	0
NAD(P)H / FMN	0.3/0.1	0
NAD(P)H / FAD	0.3/0.1	0

Las actividades se midieron según se describe en Materiales y Métodos con los diferentes donadores y cofactores a las concentraciones indicadas en la Tabla. Se utilizaron preparaciones de membranas obtenidas por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos. El 100 % de actividad corresponde a 20 mU/mg .

*R. capsulata* E1F1. Sólo resultaron eficaces los viológenos reducidos químicamente y los flavín nucleótidos reducidos fotoquímicamente con EDTA. De todos ellos el más eficaz fué el metil viológeno reducido con ditionito, por lo que se empleó como donador en el ensayo estándar. Por el contrario, las flavinas reducidas químicamente fueron ineficaces, al igual que los piridín nucleótidos reducidos, solos o en presencia de flavinas.

El efecto inhibitor de diversos agentes químicos sobre la actividad MVH-NR se presenta en la Tabla VI. El  $\text{CN}^-$ , a una concentración 0.1 mM, fué el inhibitor más eficaz (78%), seguido del pHMB y del DTE. También importante, aunque algo menor, fué la inhibición producida por algunos agentes quelantes de metales, como  $\text{N}_3^-$ , *o*-fenantrolina y  $\text{CNO}^-$ . El  $\text{ClO}_3^-$ , a concentración 2 mM, sólo inhibió un 10% la actividad NR dependiente de metil viológeno reducido.

#### III.2.1.2. pH óptimo del ensayo

La actividad enzimática se vió afectada por el tampón en el que se realizó el ensayo y por el pH del mismo. En la Fig.12 se recogen los valores de actividad obtenidos en tampón fosfato, TRIS-HCl y carbonato, desde pH 6.0 hasta 11.0. La mayor actividad se obtuvo en el tampón TRIS-HCl de pH 8.0.

#### III.2.1.3. Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima

Cuando la NR de *R. capsulata* E1F1 se incubó 5 minutos, a temperatura ambiente, a distintos pH y con varios tampones,

TABLA VI

EFEECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE EXTRACTOS ACELULARES DE *R. capsulata* E1F1 .

Inhibidor	Concentración ( mM )	Inhibición ( % )
Ninguno	-	0
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato <sup>a</sup>	0.5	13
	2	83
Ditioeritritol <sup>a</sup>	1	53
<i>o</i> -fenantrolina <sup>b</sup>	2	40
KCN	0.1	78
NaN <sub>3</sub>	2	66
KCNO	1	30
KClO <sub>3</sub>	2	10

Las actividades se midieron con metil viológeno reducido por ditionito, utilizando preparaciones de membranas obtenidas por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos.

*a* la mezcla de ensayo, sin ditionito, se preincubó durante 5 minutos a 30°C con el inhibidor y el extracto enzimático.

*b* la enzima fué reducida por iluminación ( 2.8 kW/m<sup>2</sup> ) a 25°C en condiciones anaeróbicas con FMN 0.5 mM y EDTA 10 mM.

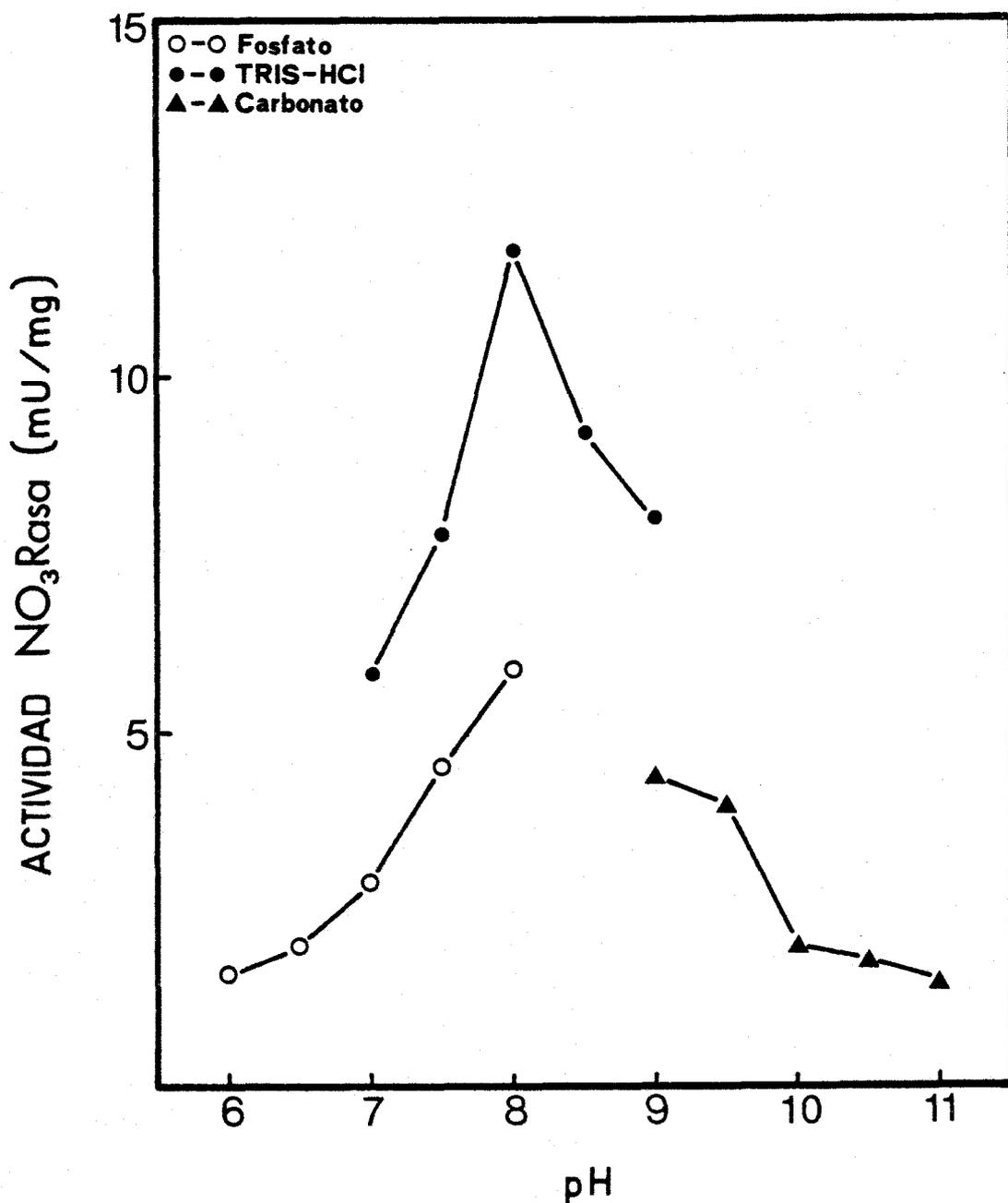


Figura 12.- pH óptimo de la reducción enzimática de nitrato a nitrito por extractos acelulares de *R. capsulata* E1F1.

El ensayo de la actividad se realizó según se describe en Materiales y Métodos, con metil viológeno reducido con ditionito como donador de electrones, utilizando en cada caso el tampón que se indica en la figura a la concentración final de 0.1 M y al pH que se indica, en sustitución del que se empleó rutinariamente.

la enzima fué estable en el intervalo de pH entre 7.5 y 9.0 (Fig.13).

### III.2.2. *Efecto del volframato sobre el crecimiento y la actividad nitrato reductasa*

La adición de volframato al medio de cultivo con  $\text{KNO}_3$  afectó al crecimiento y a la actividad nitrato reductasa de células de *R. capsulata* E1F1 (Fig.14). Al aumentar la concentración de volframato en el medio de cultivo, el crecimiento fué disminuyendo hasta un 50% del que tenía el cultivo control, con  $\text{WO}_4^{2-}$  1 mM. A esta misma concentración la actividad NR era un 88% inferior a la de los cultivos sin volframato, observándose, además, una disminución drástica de la excreción de nitrito al medio.

### III.3. CARACTERIZACIÓN *in situ* DEL SISTEMA DE REDUCCION ENZIMÁTICA DE NITRITO EN CELULAS DE *R. capsulata* E1F1

#### III.3.1. *Caracterización del ensayo de la actividad nitrito reductasa*

La nitrito reductasa de células de *R. capsulata* E1F1 se caracterizó en extractos acelulares obtenidos por choque osmótico, utilizando como sistema donador de electrones el metil viológeno reducido con ditionito. Sólo se detectó actividad significativa cuando se ensayó el sistema completo, observándose una cierta actividad remanente en ausencia del viológeno o con

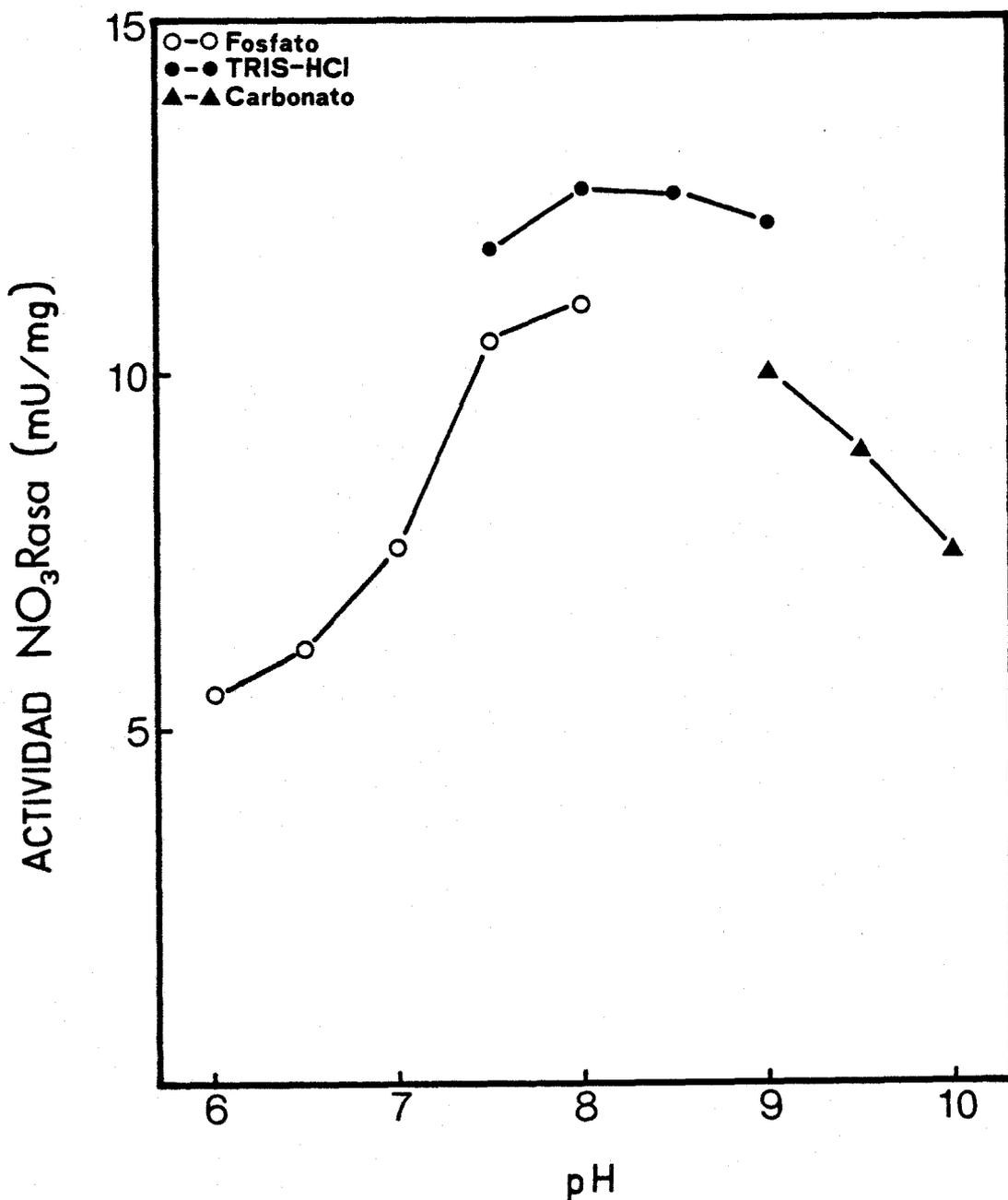


Figura 13.- Efecto del pH sobre la estabilidad de la nitrato reductasa de extractos acelulares de *R. capsulata* E1F1.

Los extractos se preincubaron 5 minutos al pH indicado en la gráfica con los distintos tampones y el ensayo se llevó a cabo a pH 8.0 con Tris-HCl como se describe en Materiales y Métodos.

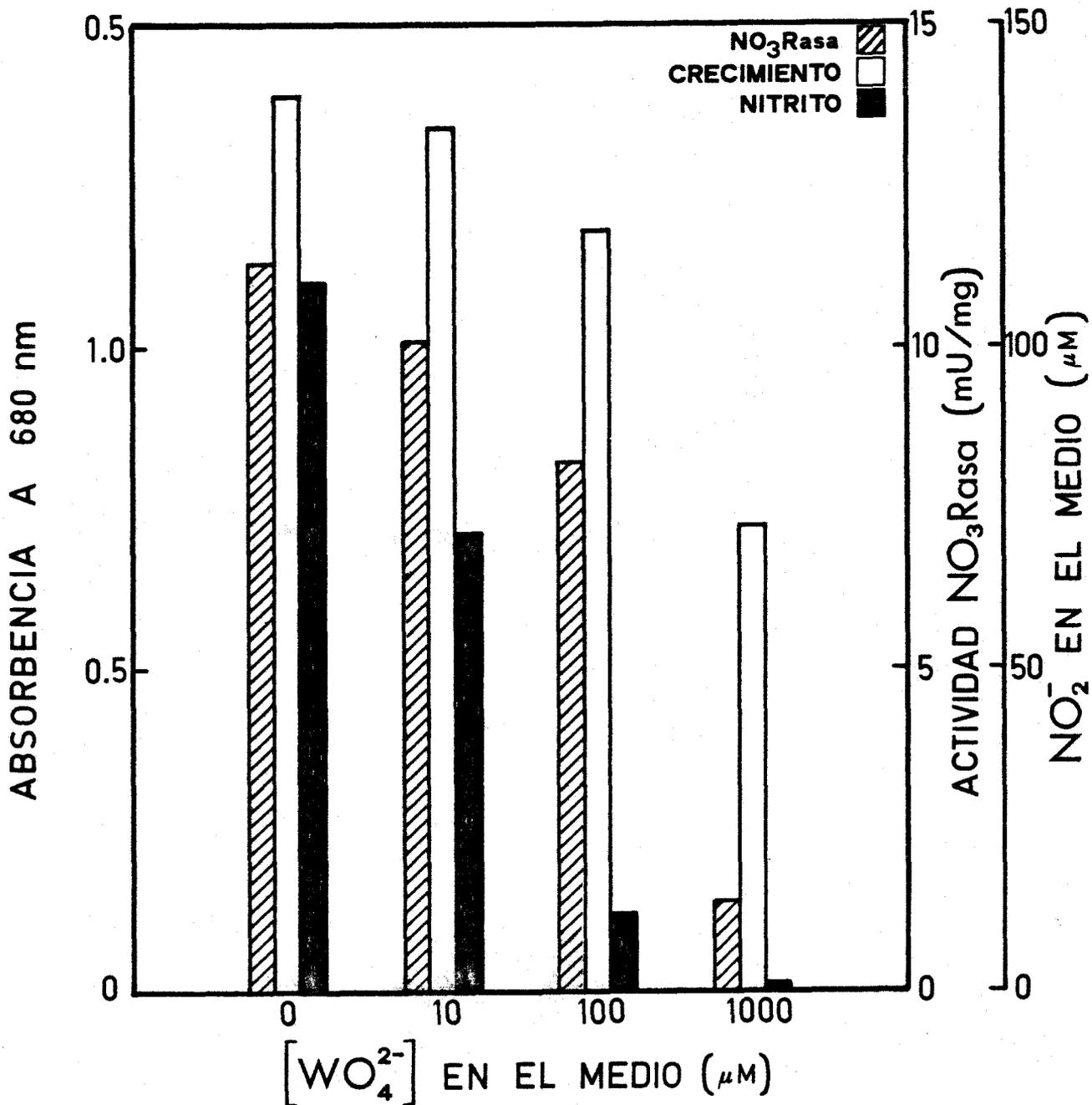


Figura 14.- Efecto de la concentración de volframato sobre el crecimiento y la actividad nitrato reductasa de células de *R. capsulata* E1F1.

Células cultivadas fototróficamente en medios RCV sin molibdeno y con NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno se inocularon en medios con las concentraciones de WO<sub>4</sub><sup>=</sup> que se indican en la figura y con KNO<sub>3</sub> 10mM como fuente de nitrógeno. A las 24 horas de cultivo se determinaron los distintos parámetros como se describe en Materiales y Métodos.

extracto hervido (Tabla VII).

El proceso de reducción de nitrito fué estequiométrico con la aparición de amonio en el medio, en las condiciones del ensayo (Tabla VIII).

#### III.3.1.1. Donadores de electrones e inhibidores

Entre los diversos sistemas donadores de electrones ensayados para la reducción *in situ* de nitrito catalizada por extractos de *R. capsulata* E1F1, el más eficaz fué el que contenía metil viológeno reducido con ditionito. El bencil viológeno y las flavinas, reducidos químicamente, resultaron mucho menos eficaces, siendo algo mayor la actividad si las flavinas se reducían fotoquímicamente en presencia de EDTA. El ditionito por sí solo también tuvo alguna efectividad como donador de electrones. Los piridín nucleótidos reducidos, solos o en presencia de flavinas, fueron incapaces de llevar a cabo la reducción del nitrito. El citocromo *c* reducido o las ferredoxinas reducidas de *Clostridium pasteurianum* y *Anabaena* sp. 7119 fueron eficaces donadores de electrones de la NiR de *R. capsulata* E1F1 (Tabla IX).

En la Tabla X se presenta el efecto producido por diversos agentes quelantes de metales sobre la actividad MVH-NiR de extractos acelulares de *R. capsulata* E1F1. La *o*-fenantrolina, el dietilditiocarbamato y el EDTA produjeron una disminución de la actividad entre un 54 y un 70%, mientras que la 2, 2'-bipiridina inhibió un 39% y la 8-hidroxiquinoleína sólo un 30%, igual que el HQNO a una concentración 9 veces menor.

TABLA VII

CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE REDUCCION ENZIMATICA DE  $\text{NO}_2^-$  A  $\text{NH}_4^+$   
 POR LA NITRITO REDUCTASA DE *R. capsulata* E1F1 .

Sistema	Actividad $\text{NO}_2$ Rasa ( mU / mg )	Actividad relativa (%)
Completo	170	100
Menos nitrito	0	0
Menos metil viológeno	8	5
Menos ditionito	0	0
Completo, extracto hervido	6	4

El sistema completo incluía en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{moles}$  de tampón fosfato, pH 7.0; 2  $\mu\text{moles}$  de  $\text{KNO}_2$  ; 0.2  $\mu\text{moles}$  de metil viológeno ; 15  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  , y extracto acelular con 1 mg de proteína por ml, obtenido por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA VIII

ESTEQUIOMETRIA DE LA REDUCCION DE NITRITO Y LA FORMACION DE AMONIO CATALIZADA POR LA NITRITO REDUCTASA DE *R. capsulata* E1F1.

Tiempo (min)	Nitrito desaparecido ( $\mu\text{mol}$ )	Amonio formado ( $\mu\text{mol}$ )	$\frac{\text{Nitrito desaparecido}}{\text{Amonio formado}}$
10	1.9	1.8	1.05
15	2.5	2.2	1.13
20	3.2	2.7	1.18

Se utilizó el ensayo estándar de la nitrito reductasa, a 30°C con metil viológeno reducido por ditionito, con preparaciones de enzima (12.4 mg proteína / ml) que tenían una actividad específica de 153 mU/mg (0.1 ml de preparación por cada ml de mezcla de ensayo). A los tiempos indicados se interrumpió la reacción enzimática y, en dos alícuotas, se determinó el nitrito desaparecido y el amonio formado, como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA IX

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES PARA LA REDUCCION ENZIMATICA DE NITRITO A AMONIO POR EXTRACTOS ACELULARES DE *R. capsulata* E1F1 .

Donador de electrones y cofactor	Concentración ( mM )	Actividad NO <sub>2</sub> Rasa (unidades relativas)
S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	5	8
Metil viológeno / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.2 / 5	100
Bencil viológeno / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.2 / 5	14
FMN / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.1 / 5	10
FAD / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0.1 / 5	11
Citocromo c / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	1 / 5	30
Fd <i>Clostridium</i> / S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	1 / 5	61
Fd <i>Anabaena</i> / NADPH <sup>a</sup>	1 / 2	21
FMN / EDTA, luz	0.5 / 10	20
FMN / EDTA	0.5 / 10	0
NAD(P)H	0.3	0
NAD(P)H / FMN	0.3 / 0.1	0
NAD(P)H / FAD	0.3 / 0.1	1

Las actividades con los diferentes donadores y cofactores, a las concentraciones indicadas en la Tabla, se midieron según se describe en Materiales y Métodos. El 100 % de actividad corresponde a 178 mU/mg de proteína.

<sup>a</sup> el ensayo incluye también NADPRasa de *Anabaena* sp 7119 .

TABLA X

EFFECTO DE AGENTES QUELANTES DE METALES SOBRE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA DE *R. capsulata* E1F1 .

Quelante	Concentración ( mM )	Inhibición ( % )
Ninguno	-	0
o-fenantrolina	5	54
8-hidroxiquinoleína	5	30
N-óxido de 2-n-heptil-4-hidroxi quinoleína	0.6	30
2,2'-bipiridina	5	39
Dietilditiocarbamato	5	62
Antimicina A	5	13
Na <sub>2</sub> EDTA	5	70

Las actividades se midieron con metil viológeno reducido químicamente, utilizando extractos acelulares obtenidos por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos. Excepto para el EDTA, la enzima se incubó 5 minutos con los quelantes antes de iniciar la reacción.

### III.3.1.2. pH óptimo del ensayo

La actividad NiR de extractos acelulares en los tampones y a los pH que se indican en la Fig.15, era máxima en tampón de fosfato a pH 7.0, observándose que en dicho tampón la influencia del pH sobre el ensayo era menos marcada que en TRIS-HCl.

### III.3.1.3. Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima

La NiR de extractos acelulares de *R. capsulata* E1F1 fué relativamente estable cuando se incubó, a temperatura ambiente, durante una hora en tampones fosfato de pH 6.0 a 7.0 (Fig.16). La actividad se redujo en un 50% tras una hora a pH 7.5, o tras 30 minutos a pH 8.0 .

### III.3.2. *Efecto del hierro sobre el crecimiento y las actividades nitrato y nitrito reductasas*

En la Fig.17 se observa el aumento del nivel de crecimiento de las células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, al aumentar la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  en el medio de cultivo. También puede observarse como el tiempo de generación disminuyó de forma progresiva en casi 2 horas cuando se fué aumentando la concentración de hierro desde 10 nM hasta 100  $\mu\text{M}$ .

La actividad NiR aumentó considerablemente con la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras que la actividad NR resultó independiente de dicha concentración (Fig.18).

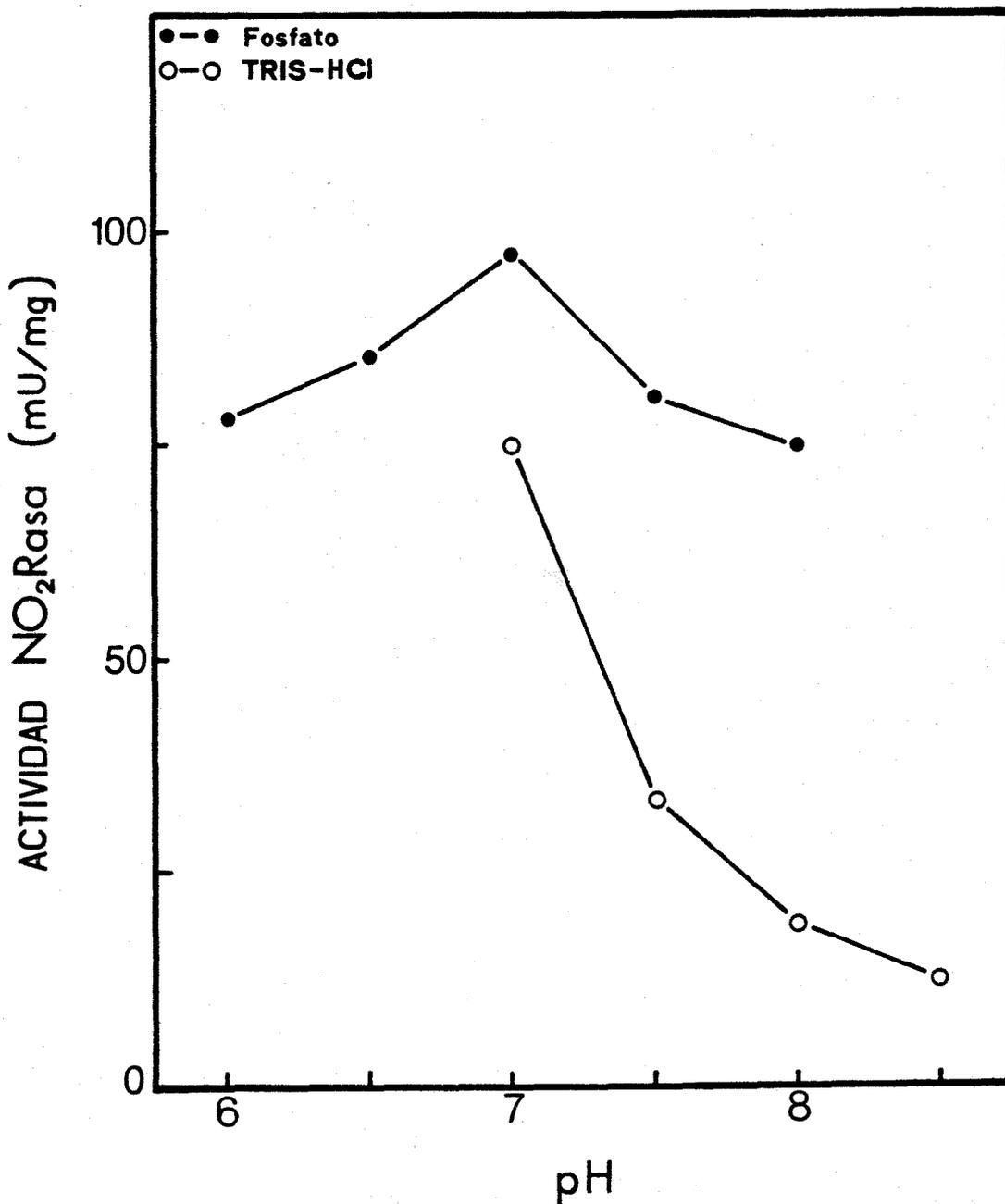


Figura 15.- *pH óptimo de la reducción enzimática de nitrito a amonio por extractos acelulares de R. capsulata E1F1.*

El ensayo de la actividad se realizó según se describe en Materials y Métodos, con metil viológeno reducido con ditionito como donador de electrones, utilizando en cada caso el tampón que se indica en la figura a la concentración final de 0.1 M y al pH indicado, en sustitución del que se empleó en el ensayo estándar.

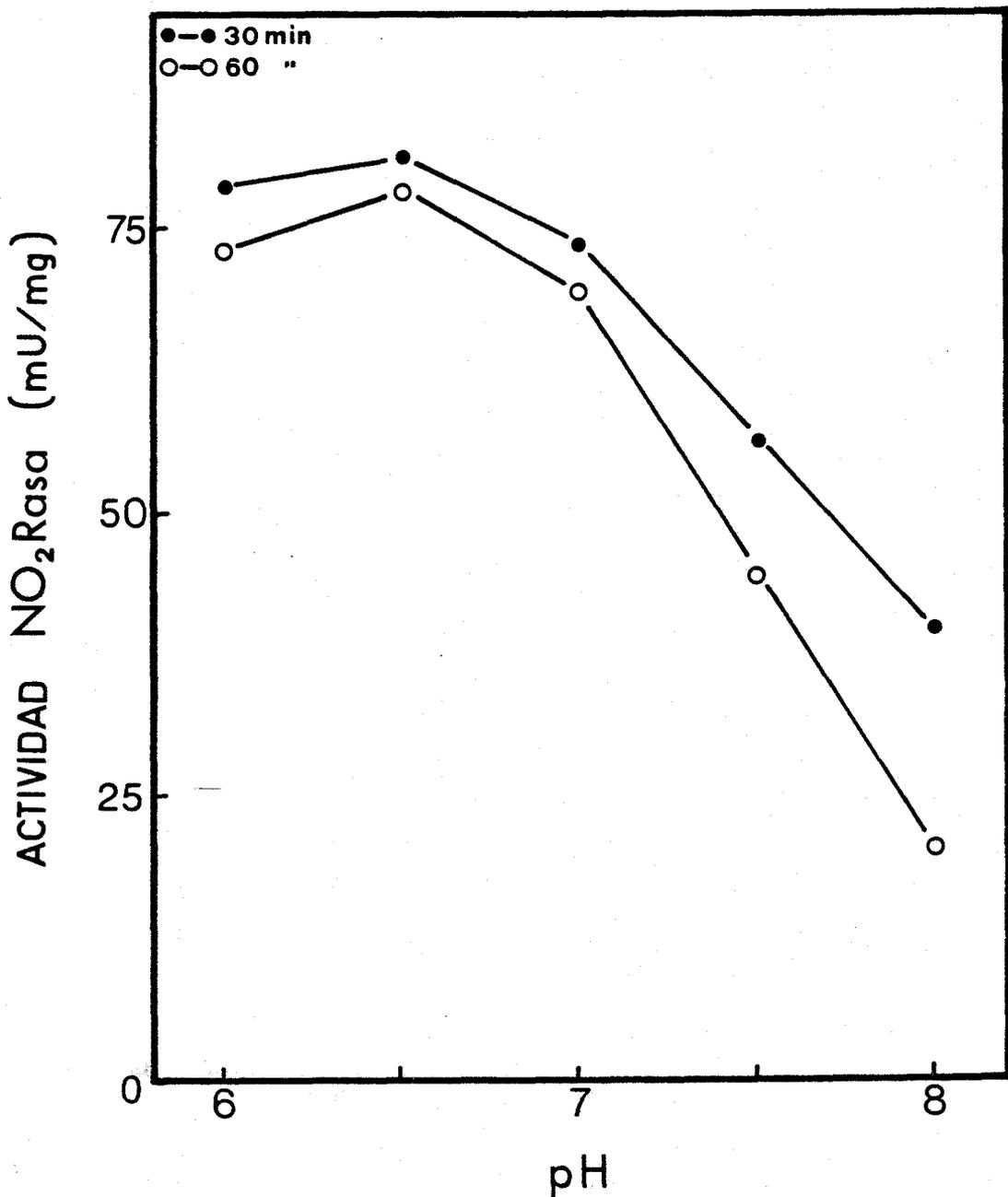


Figura 16.- Efecto del pH sobre la estabilidad de la nitrito reductasa de extractos acelulares de *R. capsulata* E1F1.

Los extractos se preincubaron 30 y 60 minutos en diferentes tampones de fosfato a los pH indicados en la gráfica. El ensayo se llevó a cabo a pH 7.0 con fosfato como se describe en Materiales y Métodos.

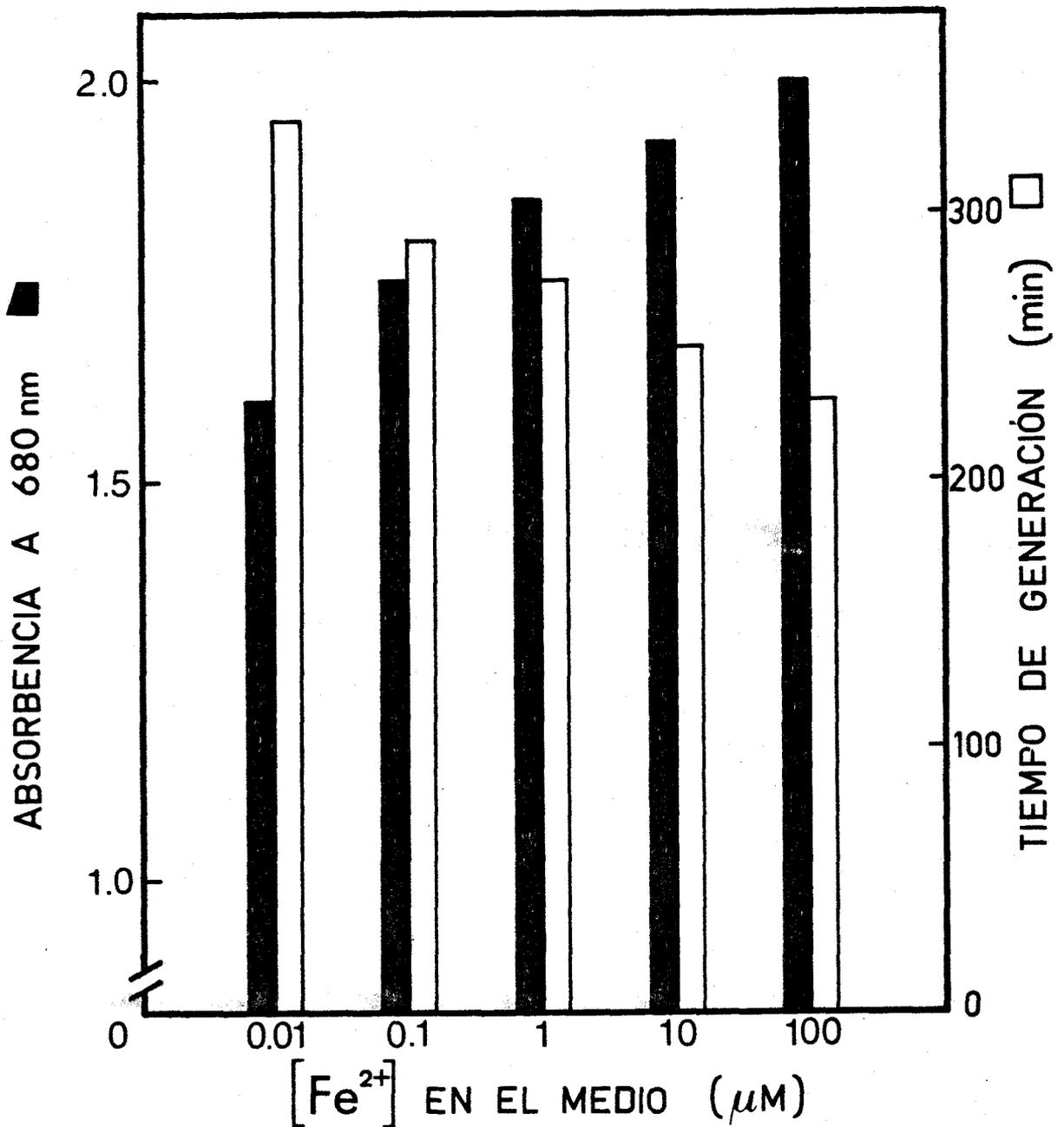


Figura 17.- Efecto de la concentración de hierro sobre el crecimiento y el tiempo de generación de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$ .

Células procedentes de 6 cultivos sucesivos en medios deficientes en hierro y con  $NH_4Cl$  como fuente de nitrógeno, se inocularon en medios con las concentraciones de  $FeSO_4$  que se indican en la figura y con  $KNO_3$  como fuente de nitrógeno. El crecimiento se determinó a las 36 horas y los tiempos de generación se calcularon a partir de los datos de crecimiento en los distintos medios.

### III.4. PURIFICACIÓN HASTA HOMOGENEIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *R. capsulata* E1F1

#### III.4.1. *Precipitación por detergentes*

A 45 ml del extracto obtenido por sonicación y posterior centrifugación (cfr. II.2.1.2.) se añadieron 2 ml de MTA al 5% (concentración final 0.2%, p/v). La suspensión resultante se dejó estar a temperatura ambiente 15 minutos y se centrifugó a 36 000 *g* durante 10 minutos. Se obtuvo un sobrenadante claro con la misma actividad total que el extracto crudo inicial, aunque con un 30% menos de proteína. El precipitado tenía una ligera actividad residual y el resto de la proteína. Cuando el extracto se trató con TRITÓN X-100 (concentración final 0.6%, v/v) sólo precipitó un 12% de la proteína y el sobrenadante, más coloreado que con MTA, perdió un 5% de la actividad inicial (Tabla XI).

#### III.4.2. *Cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP sefarosa*

El sobrenadante obtenido de la precipitación con MTA se diluyó dos veces con tampón MOPS 50 mM, pH 7.0, y se pasó a través de una columna de 2',5'-ADP sefarosa 4B, suspendida en el tampón estándar (cfr. II.4.3.), con un flujo de 18 ml/h.

En la Fig.19 se presentan los perfiles de elución de proteína y de la actividad transferasa de la GS, obtenidos en la cromatografía de afinidad. En las primeras fracciones salieron las proteínas que no presentaban afinidad por la matriz de

TABLA XI

TRATAMIENTO CON DETERGENTES DE EXTRACTOS CRUDOS DE CELULAS DE *R. capsulata* E1F1

	Volumen (ml)	Proteína (mg)	A c t i v i d a d G S		
			Específica (U / mg)	Total (U)	% de la inicial
Extracto sin tratar	45	315	4.3	1356	100
Sobrenadante MTA	40	217	6.3	1361	100
Precipitado MTA	10	113	0.7	83	6
Sobrenadante TRITON	44	283	4.6	1296	95
Precipitado TRITON	10	40	1.4	56	4

Como extracto se utilizó el sobrenadante obtenido al centrifugar células de *R. capsulata* E1F1 rotas por ultrasonidos como se especifica en Materiales y Métodos. El sobrenadante se dividió en tres alícuotas de 45 ml, de las que en una se disolvió TRITON 0.6% (p/v) y en otra MTA al 0.2% (p/v), utilizándose la tercera como control. Se trataron como se indica en el texto y a cada fracción se le determinó la actividad transferasa y la proteína como se describe en Materiales y Métodos.

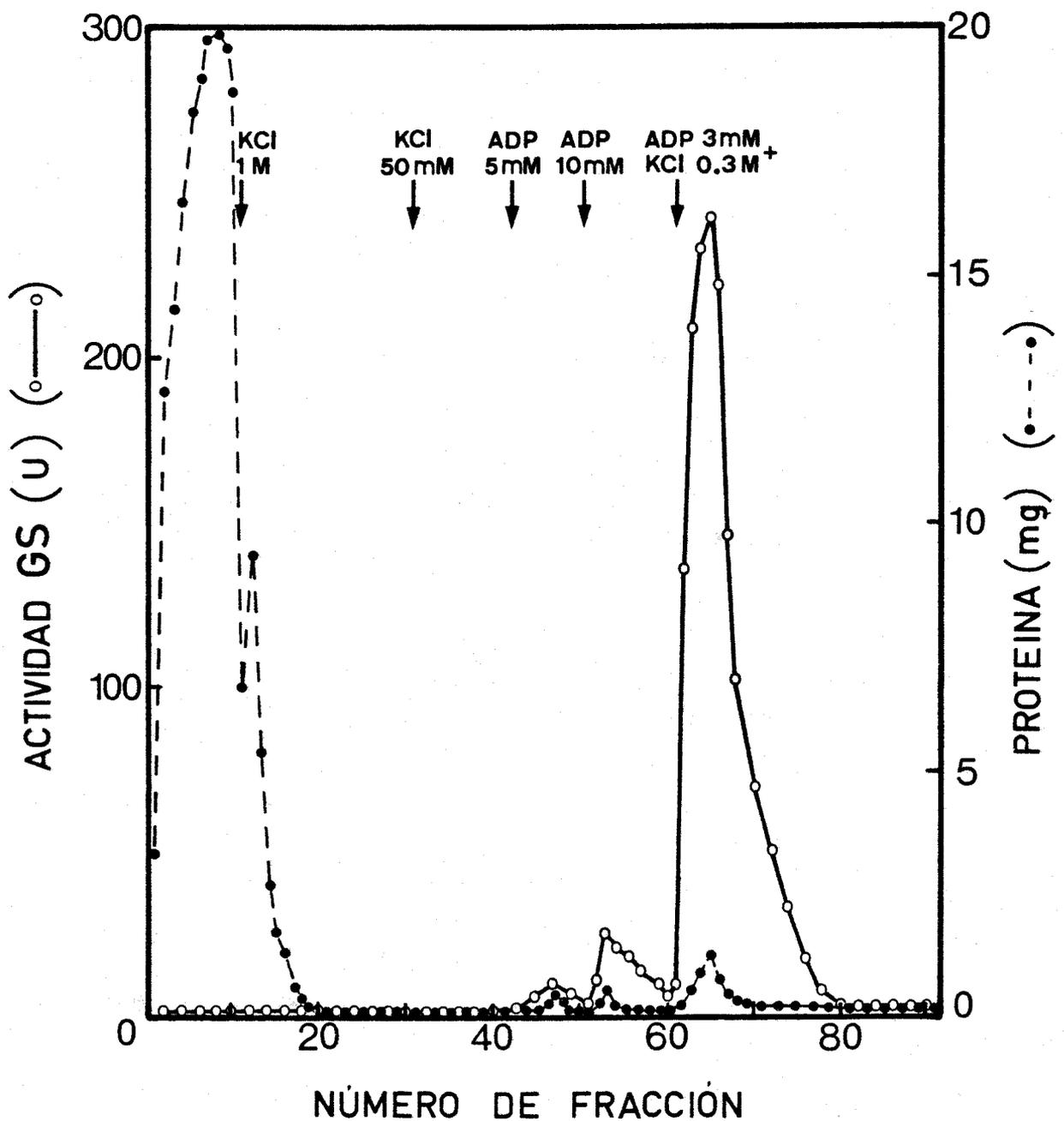


Figura 19.- Cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP sefarosa de un extracto acelular de *R. capsulata* E1F1.

El sobrenadante obtenido al precipitar con MTA como se describe en el texto (40 ml) se pasó a través de una columna de 2',5'-ADP sefarosa 4B equilibrada con el tampón estándar. Se lavó con el mismo tampón con KCl o ADP como se indica en la gráfica, recogiéndose fracciones de 2.3 ml con un flujo de 9 ml/h. En cada una se midió la actividad transferasa de la GS y la proteína como se describe en Materiales y Métodos.

la columna. Para obtener la GS de *R. capsulata* E1F1 con un rendimiento del 80% fué preciso añadir al tampón que contenía ADP 3 mM, KCl 0.3 M. La enzima no pudo ser separada de la 2',5'-ADP sefarosa cuando la columna se lavó sólo con ADP 10 mM o sólo con KCl 1 M.

#### III.4.3. *Tabla de purificación*

En la Tabla XII se resume todo el proceso de purificación. El rendimiento obtenido es alto (80%), con un grado de purificación de 123 y una actividad específica de 185 U/mg (1.3 mg de proteína pura). En el proceso global se obtuvieron 8 mg de GS pura a partir de 4 g de peso húmedo de células.

#### III.4.4. *Criterios de pureza*

Se examinó la pureza de estas preparaciones de glutamina sintetasa, aplicando criterios electroforéticos e inmunológicos.

##### III.4.4.1. Electroforesis analítica

Cuando una preparación de GS recién obtenida de la columna de ADP sefarosa se dializó rápidamente y se sometió a una electroforesis analítica en gel de acrilamida al 5%, se apreció una única banda de proteína de  $R_f = 0.25$  con una pureza mayor del 95% (Fig.20) y que correspondía a la GS como se comprobó mediante la tinción de la actividad en el gel (Fig.21). Si habían transcurrido 24 horas o más desde la purificación,

TABLA XII

PURIFICACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *R. capsulata* E1F1 .

	Vol (ml)	Proteína (mg)	A c t i v i d a d		Grado de purifi- cación ( % )	Recupe- ración ( % )
			Total ( U )	Específica (U/mg)		
Extracto crudo	50	1020	1513	1.5	1	100
Sobrenadante sonic.	45	315	1356	4.3	3	90
Sobrenadante MTA	40	217	1361	6.3	4	90
Eluato ADP-Sefarosa	45	8	1225	153	102	81
Fracción pico	3	1.3	240	185	123	16

Los detalles de la purificación se expresan en el texto. El eluato de ADP-Sefarosa se compone de las fracciones con actividad glutamina sintetasa y la fracción pico se refiere a la de mayor actividad de las obtenidas en la elución.

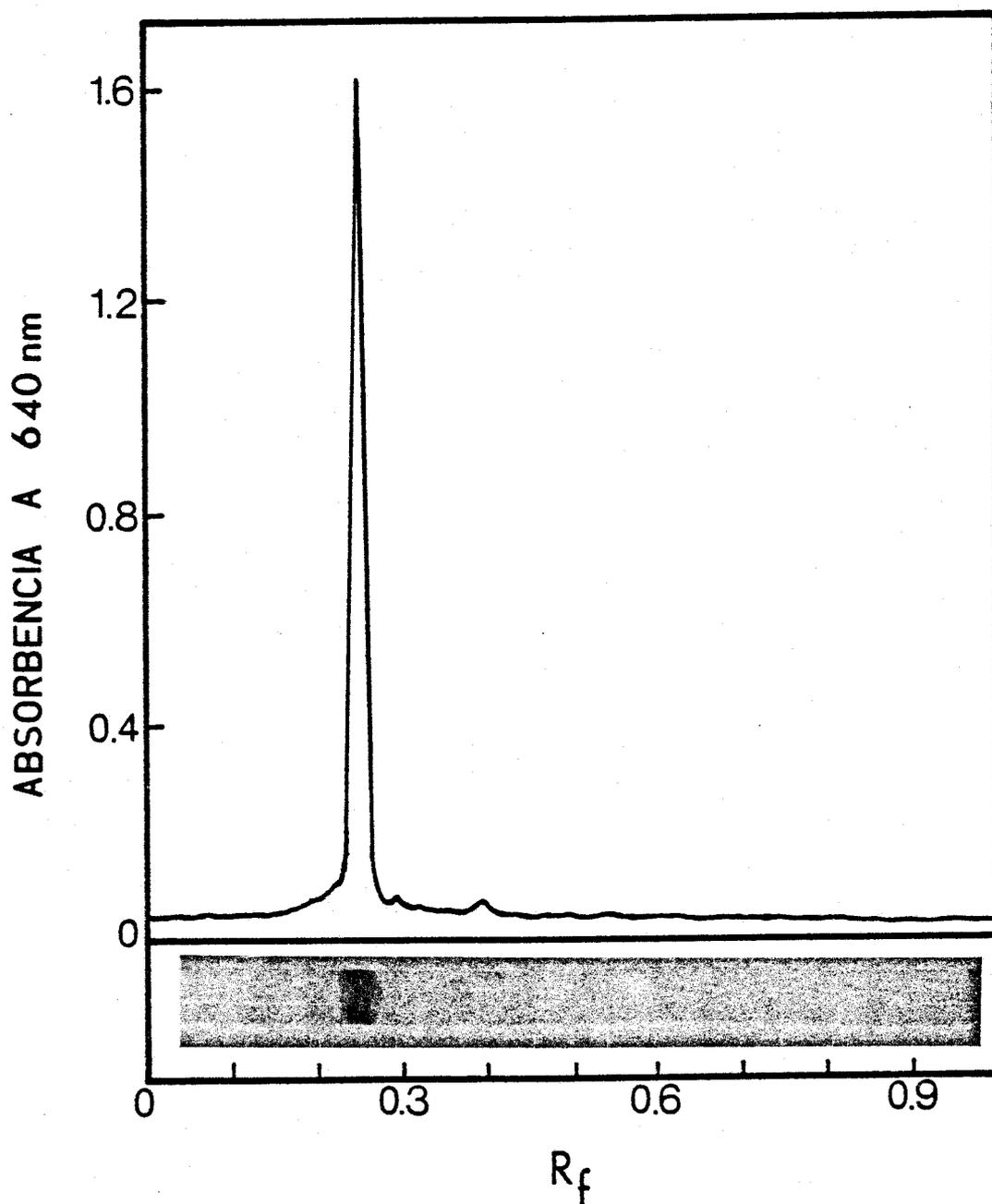


Figura 20.- *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de la glutamina sintetasa nativa de R. capsulata EIF1.*

Se aplicó una muestra de 0.1 ml que contenía 30  $\mu\text{g}$  de proteína recién purificada, a un gel de poliacrilamida al 5% y se sometió a un campo eléctrico en presencia de tampón Tris-glicina, pH 8.3, como se describe en Materiales y Métodos. Una vez finalizada la electroforesis se tiñó el gel para proteína como se especifica en dicho apartado y se obtuvo el correspondiente densitograma a 640 nm.

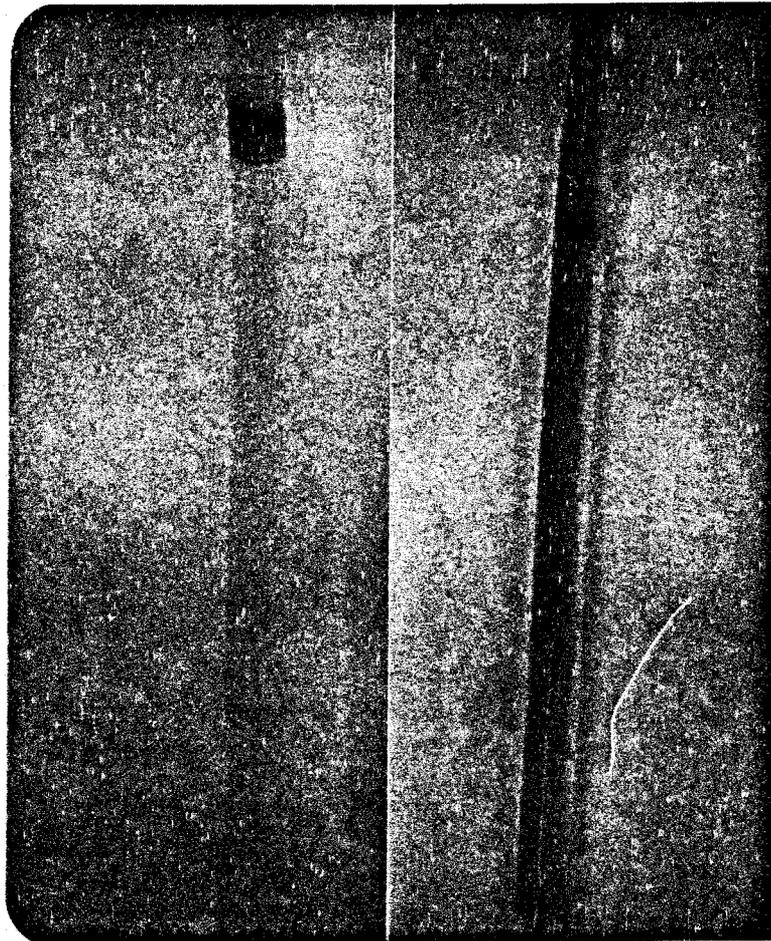


Figura 21.- *Visualización de la electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de la glutamina sintetasa purificada de R. capsulata E1F1.*

La fotografía corresponde a una electroforesis desarrollada en las condiciones detalladas en la Fig.22. Las tinciones para proteina y para la actividad glutamina sintetasa se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

al desarrollar la electroforesis se observó, además de la banda de  $R_f$  0.25, cinco nuevas bandas nítidas de proteína ( con  $R_f$  de 0.30; 0.39; 0.50; 0.66 y 0.81, respectivamente ), así como otras dos más tenues (  $R_f$ : 0.33 y 0.45 ), que representaban, en conjunto, un 35% de la proteína total (Fig.22). En estas nuevas bandas no se pudo detectar actividad GS por tinción específica del gel.

#### III.4.4.2. Métodos inmunológicos

En la Fig.23A se observa que sólo se obtuvo una banda de precipitación en la doble inmunodifusión ( Ouchterlony ) entre soluciones de GS pura y una preparación de anticuerpos anti-GS, purificados mediante una columna de inmunoafinidad. Esta banda fué sensible a la tinción de la actividad transferasa de la GS (Fig.23B).

El desarrollo de la inmunolectroforesis cruzada de una solución de GS pura en gel de agarosa, que contenía anticuerpos anti-GS purificados, dio lugar a la aparición de dos picos de precipitación (Fig.24A). Esto indica la presencia de dos proteínas que son inmunológicamente diferentes, como se desprende del cruce de las líneas en la zona de solapamiento de los precipitados. La tinción de actividad enzimática mostró que ambos picos poseían actividad GS (Fig.24B). Por último, la forma abierta de los picos puede ser debida a la disociación de la proteína en subunidades.

La monoespecificidad antígeno - anticuerpo puede utilizarse como criterio de pureza para las preparaciones enzimáticas y para los anticuerpos.

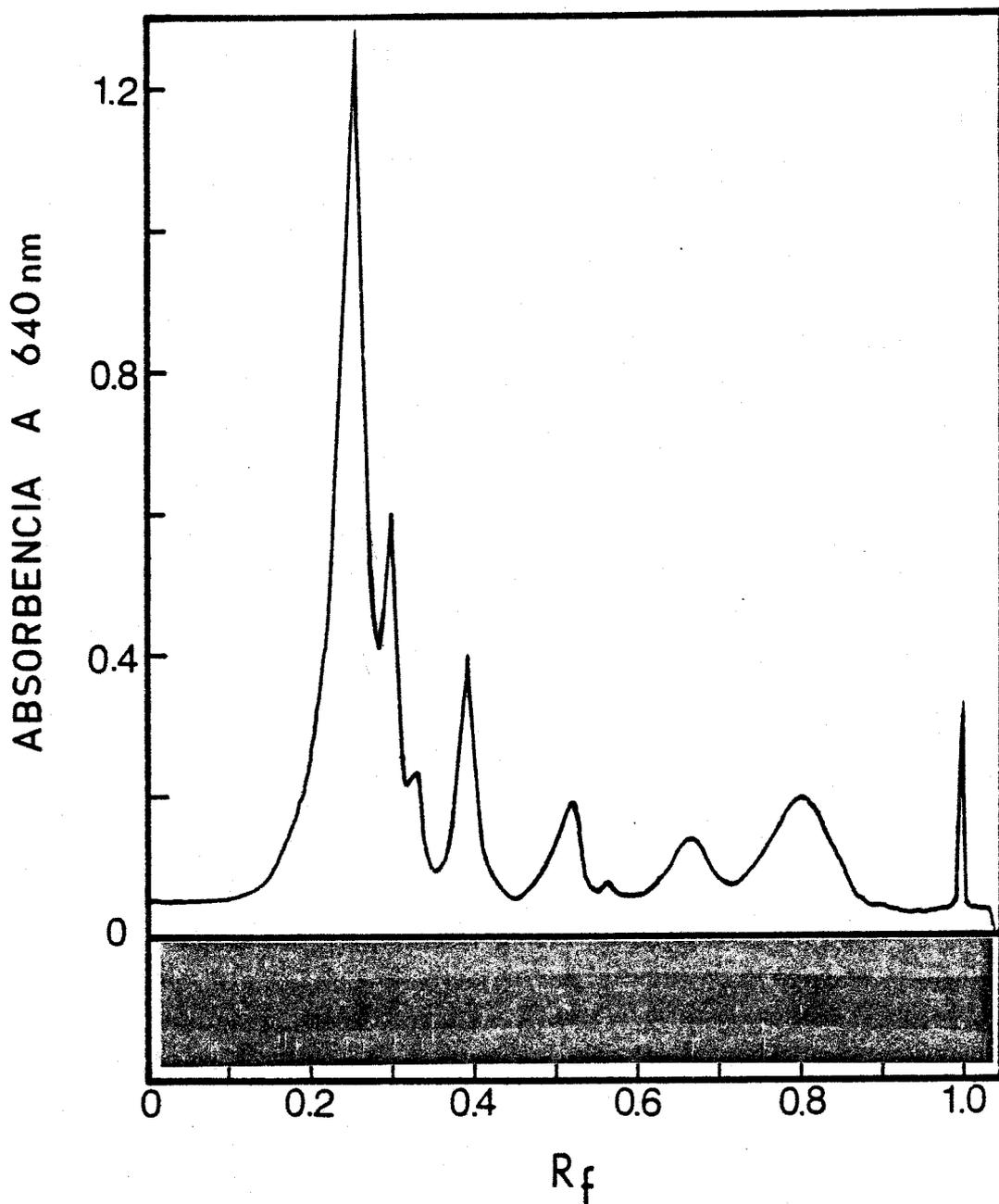


Figura 22.- *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de una preparación de glutamina sintetasa purificada de R. capsulata E1F1.*

Los detalles de la electroforesis y de la obtención del correspondiente densitograma son los mismos que se detallan en la Fig.20 con la diferencia de que la preparación enzimática se había obtenido 24 horas antes del desarrollo de la electroforesis.

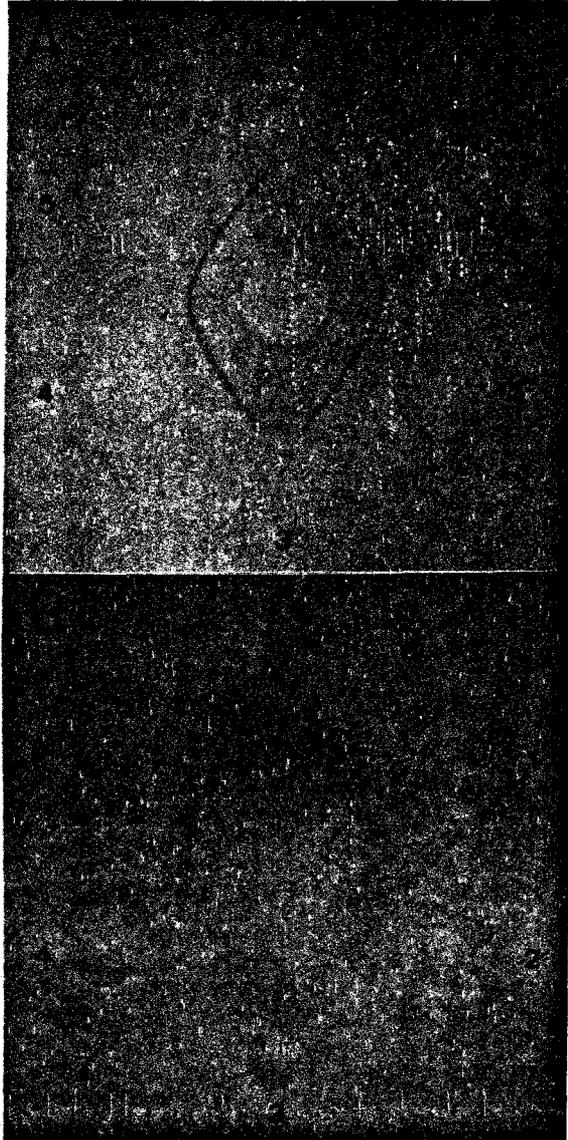


Figura 23.- *Doble inmunodifusión de la glutamina sintetasa de R. capsulata EIF1 frente a anticuerpos anti-GS.*

La doble inmunodifusión (Ouchterlony) se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos, con alícuotas de 10  $\mu$ l en cada pocillo. En el central se colocó una preparación de GS purificada (9.6  $\mu$ g con una actividad de 1.6 U), en los pocillos 1, 2, 4 y 5 preparaciones de anticuerpos purificados (4.3  $\mu$ g en cada uno) y en los pocillos 3 y 6 agua destilada. Las placas se tiñeron para proteína (A) o para actividad GS transferasa (B) .

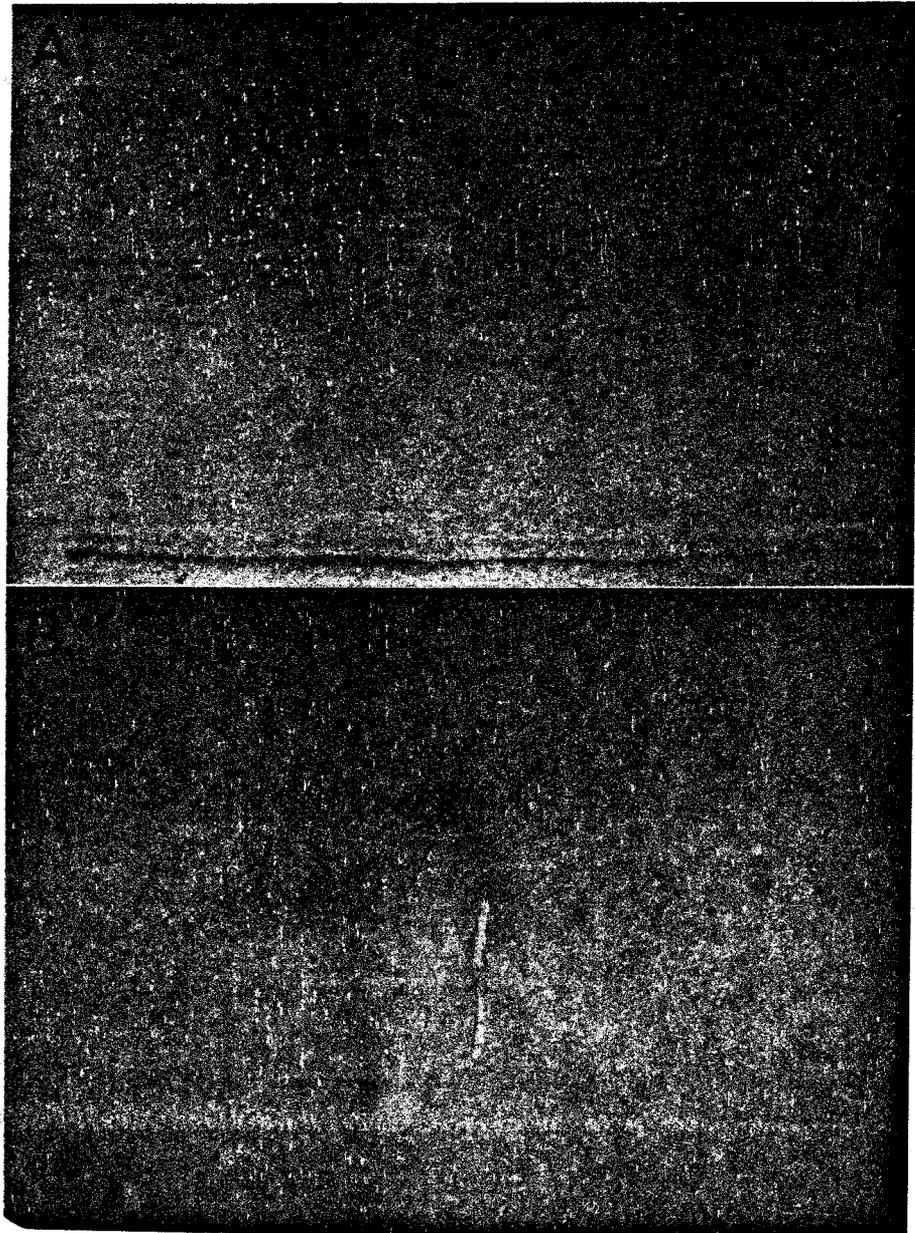


Figura 24.- *Inmunoelectroforesis cruzada de la glutamina sintetasa de R. capsulata E1F1 frente a anticuerpos anti-GS.*

La electroforesis en la primera dimensión se realizó con 25  $\mu$ l de preparaciones de GS purificada (24  $\mu$ g con una actividad de 4 U), siendo la segunda sobre un gel de agarosa que contenía anticuerpos purificados (8.6  $\mu$ g/ml gel). El resto de las condiciones experimentales, así como los procedimientos para la tinción de proteína (A) y actividad GS (B), se describen en Materiales y Métodos.

### III.5. CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *R. capsulata* E1F1

#### III.5.1. *pH* *óptimo*

En la Fig.25 se presentan los resultados obtenidos al ensayar a distintos pH la actividad de la GS, parcialmente purificada, de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Cuando el grado de adenilación era pequeño ( $\bar{n}$  cercano a 1) la actividad era máxima a pH 7.5, mientras que si la enzima estaba bastante adenilada ( $\bar{n}$  alrededor de 9) el pH óptimo era de 6.5. En el caso de células cultivadas en medio RCV con extracto de levadura, con un valor de  $\bar{n} = 6$  para la GS, la mayor actividad se obtuvo a pH 7.0 (Resultados no mostrados).

Como tampones para realizar el ensayo se emplearon, en sustitución del utilizado en el ensayo estándar, MES ( $pK_a = 5.96$ ), MOPS ( $pK_a = 7.20$ ) y TRICINA ( $pK_a = 8.15$ ) a la concentración final de 0.1 M en un intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 8.5.

#### III.5.2. *Temperatura óptima*

La determinación de la actividad transferasa de la GS se llevó a cabo en un rango de temperaturas comprendido entre 0 y 70°C, observándose que dicha actividad aumentaba con la temperatura hasta alcanzar un valor máximo a 43°C, descendiendo a continuación rápidamente hasta ser sólo un 15% a 60°C, y prácticamente nula a 70°C (Fig.26).

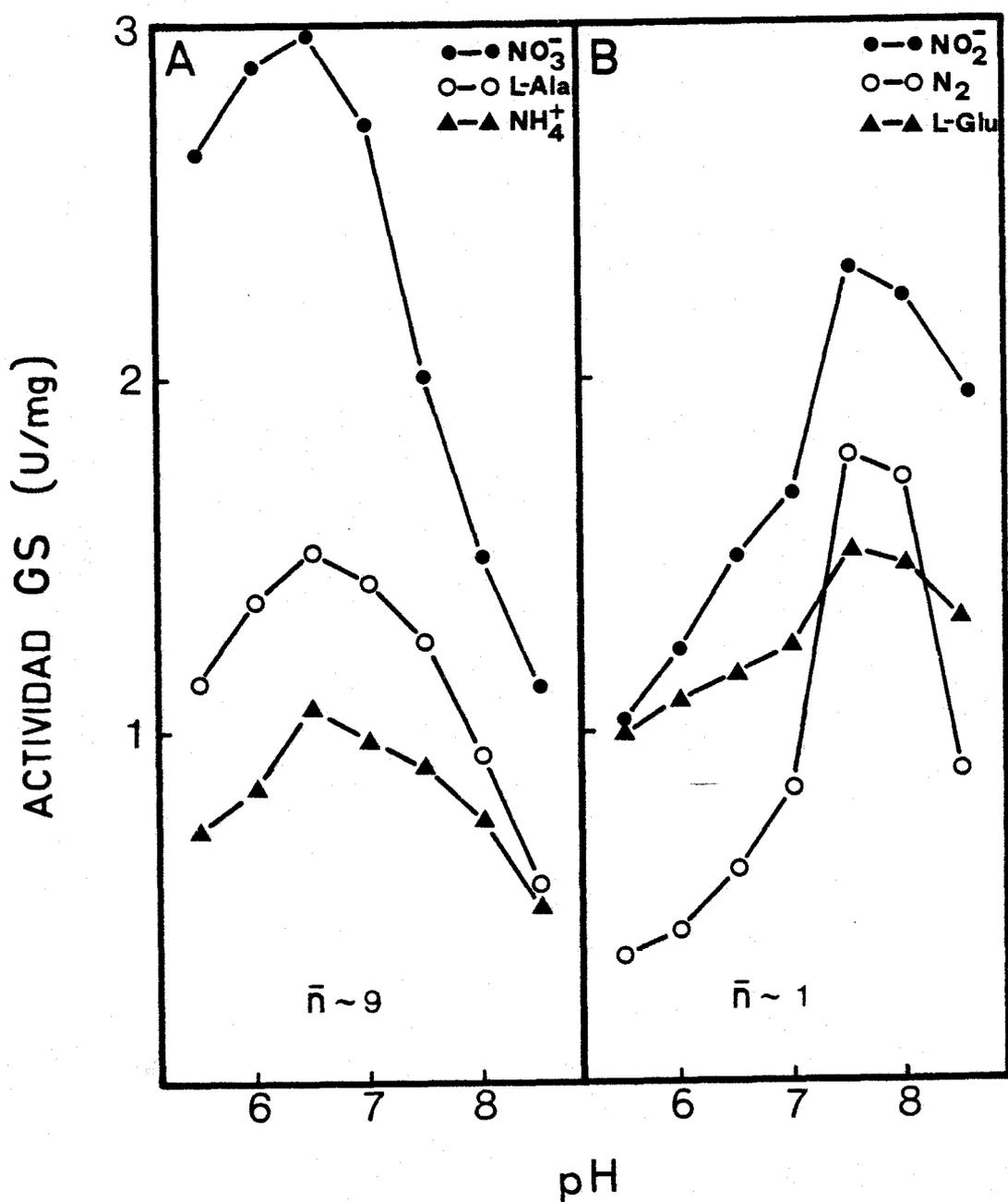


Figura 25.- *pH* óptimo para la actividad transferasa de la glutamina sintetasa adenilada y desadenilada de *R. capsulata* E1F1.

Se determinó la actividad transferasa de preparaciones de GS parcialmente purificadas, obtenidas de cultivos con las distintas fuentes de nitrógeno que se indican en la figura. Se utilizaron los tampones MES, MOPS y tricina a la concentración final de 0.1 M. El grado de adenilación de las distintas GS era: en  $\text{NO}_2^-$ , 0.5; en  $\text{N}_2$ , 0.7; en L-glutamato, 1.2; en  $\text{NO}_3^-$ , 8.4; en L-alanina, 9.1; y en  $\text{NH}_4^+$ , 10.7.

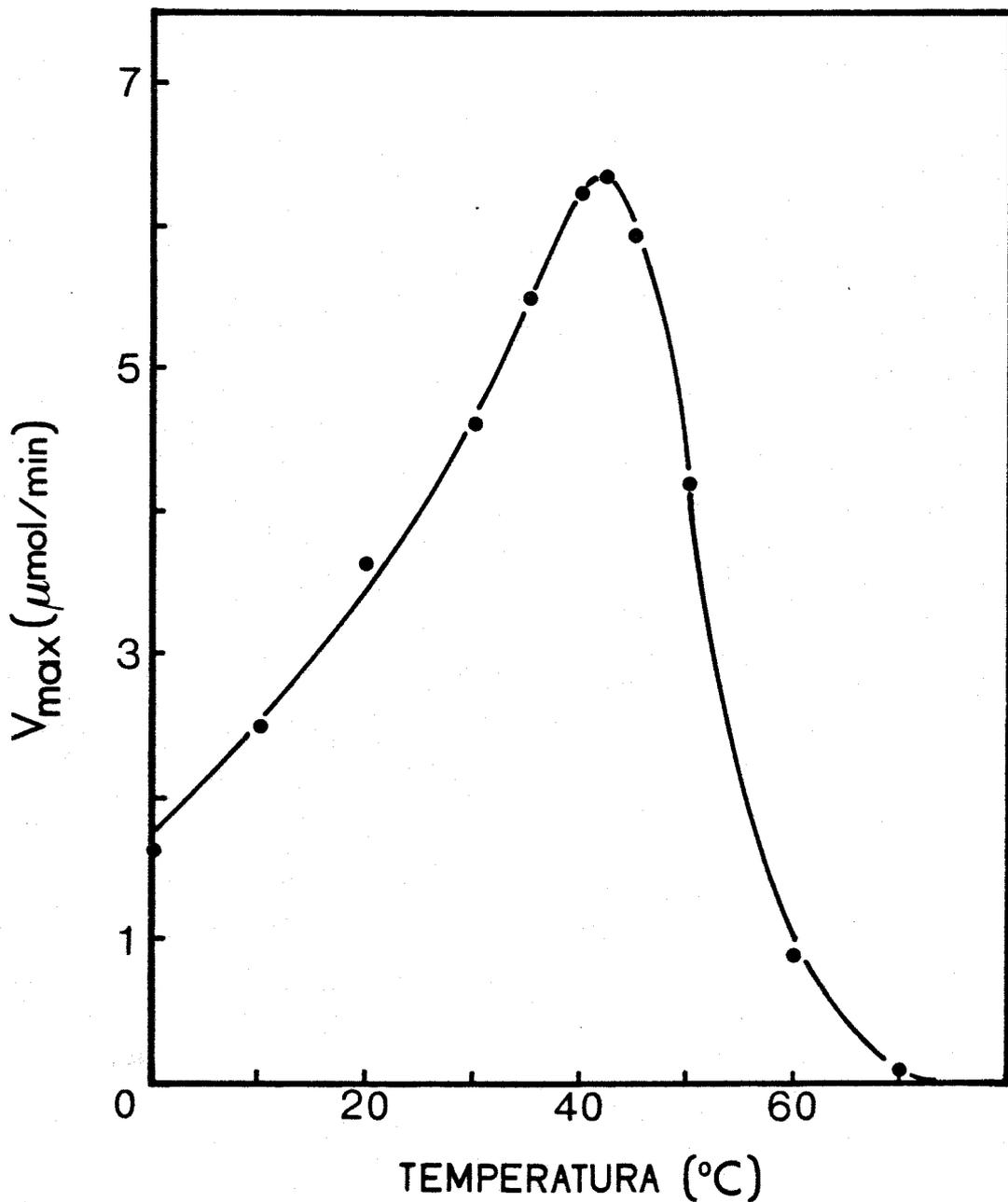


Figura 26.- Temperatura óptima para el ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

Las actividades se ensayaron a las distintas temperaturas utilizando el procedimiento estándar descrito en Materiales y Métodos. Se utilizaron preparaciones de la proteína pura (40  $\mu$ l con 1.5  $\mu$ g de proteína) con una actividad de 6.35 U/ml a la temperatura óptima.

Entre 0 y 43°C los valores de velocidad máxima, representados según la ecuación de Arrhenius, se ajustaron a una recta (Fig.27). La forma de esta ecuación es:

$$\log V_m = \log A - \frac{E_a}{2.303 R T}$$

donde  $V_m$  es la velocidad medida en el ensayo, A es una constante,  $E_a$  la energía de activación de la reacción, R la constante de los gases ( $8.3 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) y T la temperatura medida en K. A partir de la pendiente de la recta se obtuvo un valor de  $21.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para la energía de activación de esta reacción.

Utilizando los datos anteriores y mediante la fórmula

$$\log Q_{10} = \frac{10 E_a}{2.303 R T_1 T_2}$$

se calculó un valor de  $Q_{10} = 1.32$ , para el intervalo entre 30 y 40°C.

### III.5.3. Estabilidad a distintos pH y temperaturas

La GS no se afectó por el pH, durante al menos 2 horas, en el intervalo entre 5.5 y 8.0, y la disminución de la actividad no fué sensible hasta pH 9.0 (Fig.28).

A 4°C o temperaturas inferiores la desnaturalización de la enzima fué imperceptible durante varias semanas. La pérdida de actividad fué inferior al 25% después de 2 horas a temperaturas menores de 35°C, disminuyendo rápidamente la actividad a temperaturas superiores (Fig.29).

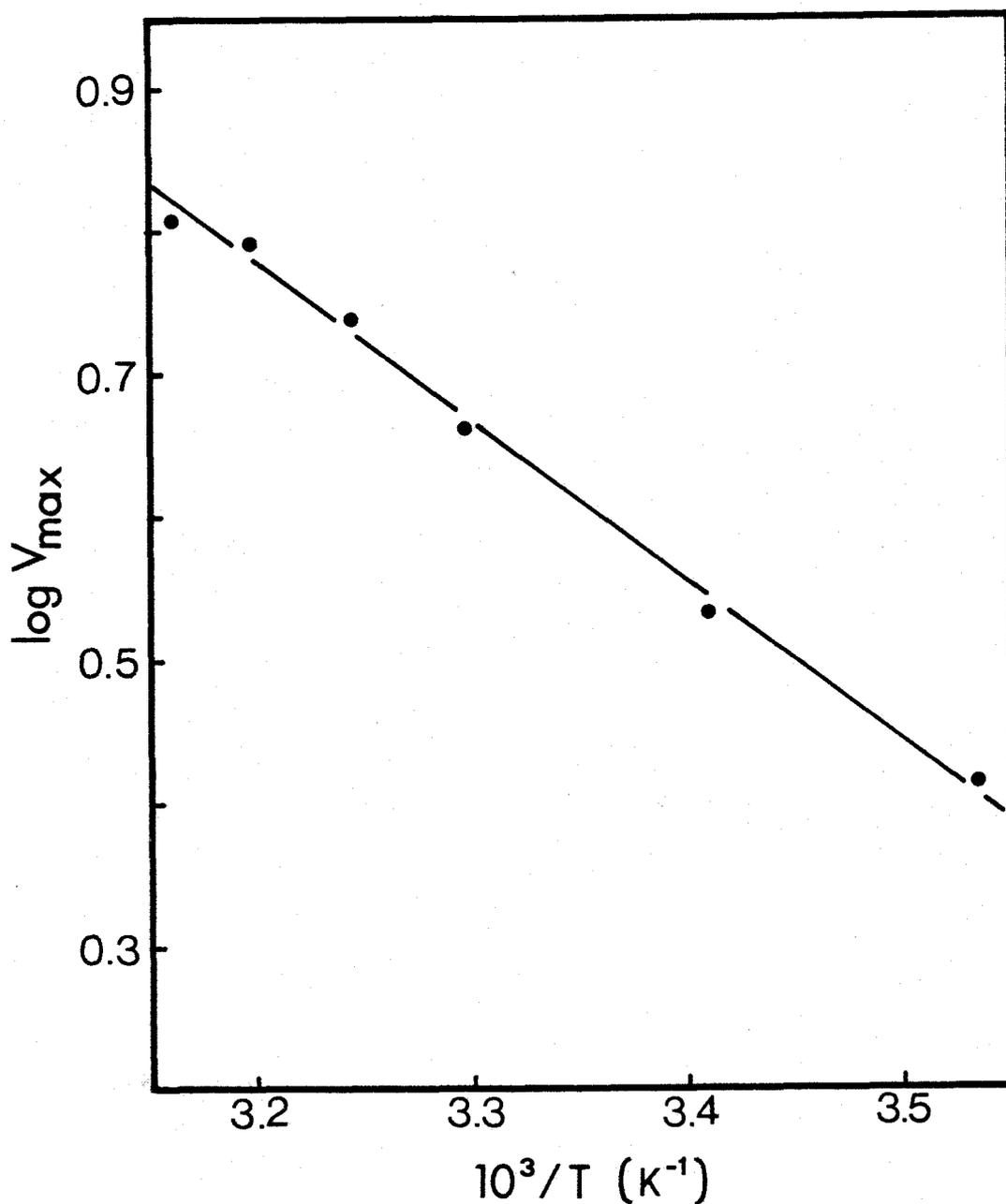


Figura 27.- *Energía de activación para la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de R. capsulata E1F1.*

La gráfica corresponde a la representación de Arrhenius de los datos de la Fig.26 para el rango de temperaturas entre 0 y 43°C.

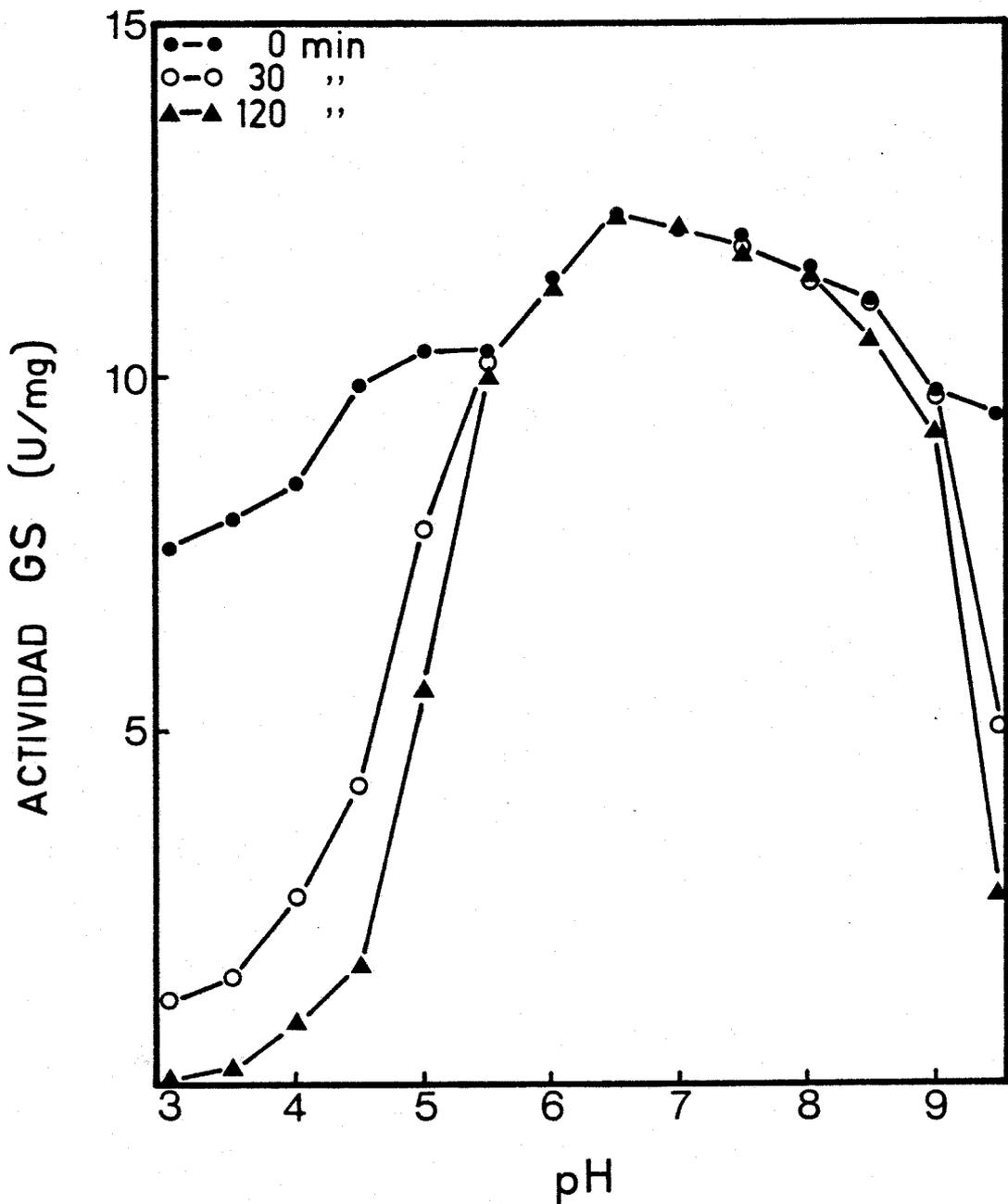


Figura 28.- Estabilidad de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 a distintos pH.

Las preparaciones de GS purificada se mantuvieron a los pH y los tiempos indicados en la figura, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas y se midió la actividad transferasa de la enzima a pH 7.0. Se utilizaron tampones citrato, MES, MOPS, tricina y glutamato a la concentración de 0.1 M.

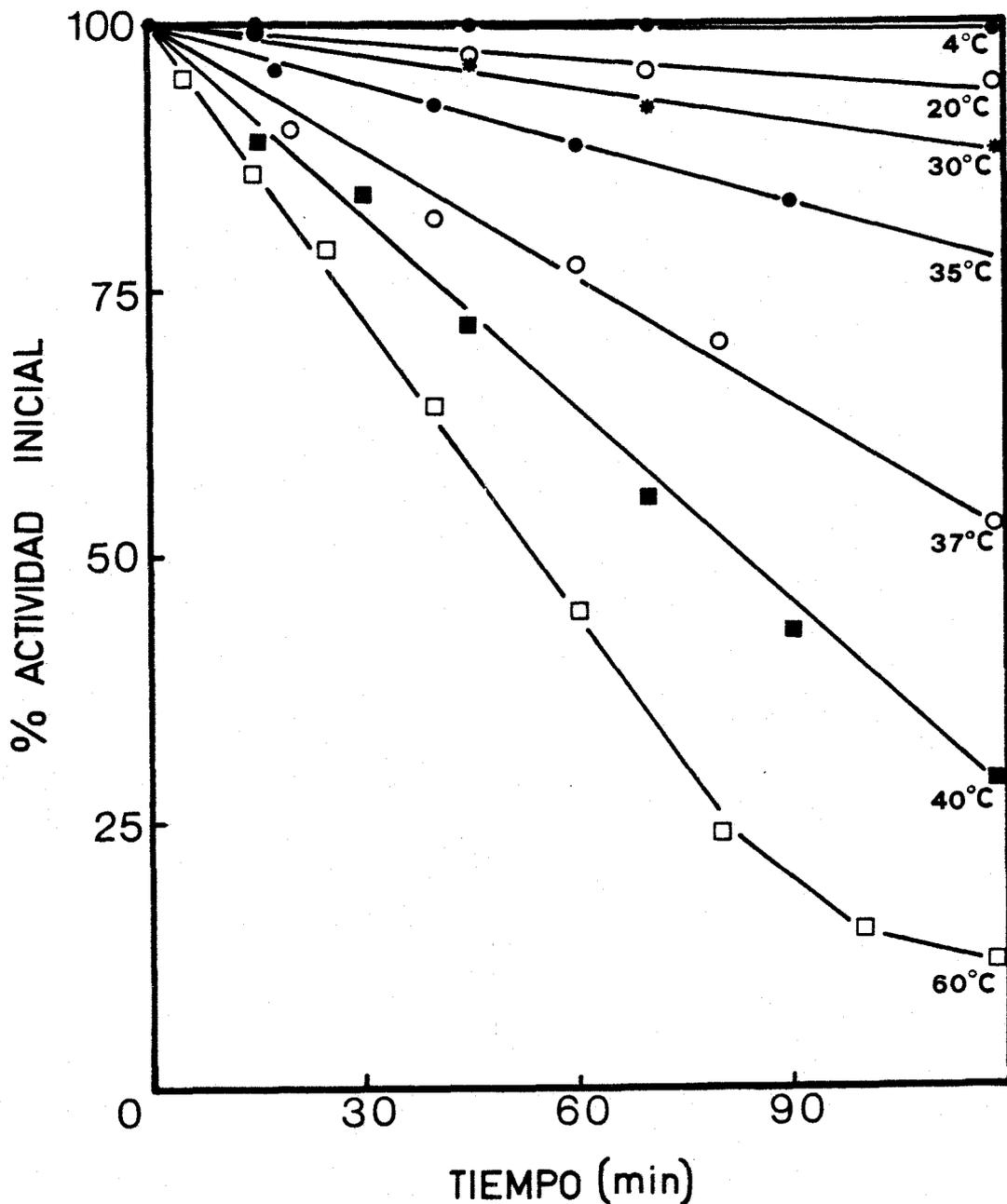


Figura 29.- Estabilidad de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 a distintas temperaturas.

Las preparaciones de GS purificada se incubaron a las temperaturas que se indican. A distintos intervalos de tiempo se determinó la actividad transferasa a 30°C en alícuotas tomadas al efecto.

#### III.5.4. *Parámetros cinéticos*

Las cinéticas de las actividades transferasa y biosintética fueron lineales durante al menos 30 y 15 minutos, respectivamente, en las condiciones óptimas de ensayo (Resultados no mostrados).

En la Tabla XIII se presentan los valores de  $K_m$  y velocidades máximas de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 para las dos actividades, transferasa y biosintética. La  $K_m$  para el ADP fué tres órdenes de magnitud inferior a la de los otros dos sustratos de la actividad transferasa. En el caso de la actividad biosintética la  $K_m$  para el  $\text{NH}_4^+$  y para el ATP fué semejante, siendo mayor para el glutamato. La velocidad máxima para la actividad transferasa, a una misma cantidad de proteína, es 22.4 veces mayor que para la actividad biosintética.

Un mol de GS de *R. capsulata* E1F1 produce 70 moles de glutamina por segundo (N.C. = 70, Tabla XIII).

#### III.5.5. *Parámetros moleculares*

##### III.5.5.1. Radio de Stokes

Se determinó por cromatografía de filtración en una columna de Bio-Gel, como se describe en Materiales y Métodos. En la Fig.30 se representan los valores obtenidos de  $(-\log K_{av})^{1/2}$  frente a los radios de Stokes de las proteínas usadas como pa-

TABLA XIII

PARAMETROS CINETICOS DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LA GLUTAMINA SINTETASA DE *R. capsulata* E1F1 .

Sustrato	ACTIVIDAD TRANSFERASA		ACTIVIDAD BIOSINTETICA		
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol s <sup>-1</sup> )	N.C. (s <sup>-1</sup> )
L-Gln	12	15	-	-	-
NH <sub>2</sub> OH	6	15	-	-	-
ADP	10 <sup>-2</sup>	17	-	-	-
L-Glu	-	-	6.5	3	70
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	-	0.3	3	70
ATP	-	-	0.5	3	70

Los distintos valores se obtuvieron mediante representaciones de dobles recíprocos de la velocidad y la concentración ( Lineaweaver - Burk ). Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos para cada actividad, variando en cada caso la concentración del sustrato de que se trate. Para las determinaciones de actividad transferasa se emplearon preparaciones que contenían 7 µg de enzima parcialmente purificada y para las de actividad biosintética otras con 30 µg de enzima pura. N.C., número de cambio.

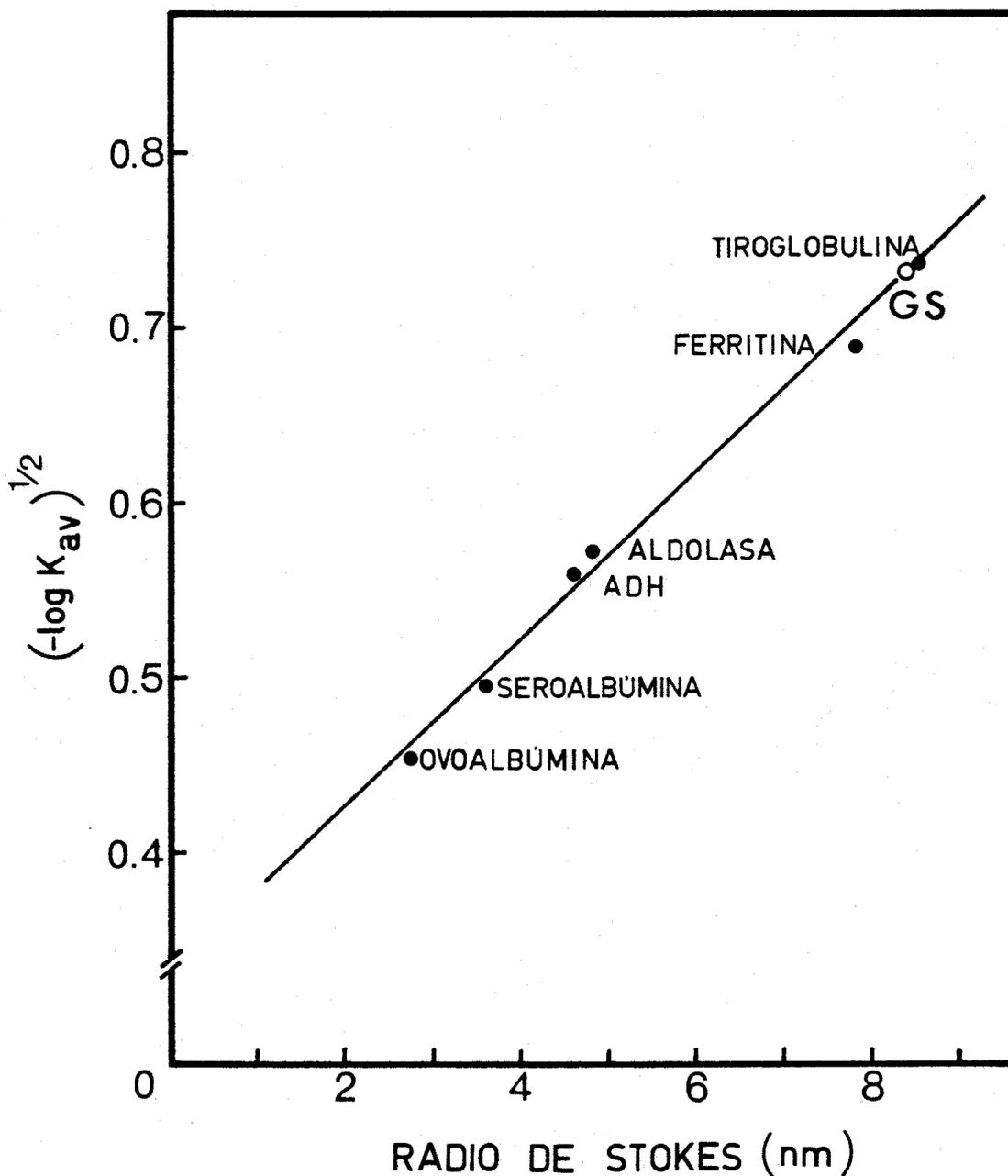


Figura 30.- Determinación del radio de Stokes de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 por cromatografía de filtración en gel.

La cromatografía se llevó a cabo en una columna de Bio-gel A 1.5 m (100-200 mesh) y se recogieron fracciones de 1.3 ml con un flujo de 30 ml/h. Como proteínas patrones se utilizaron: ovoalbúmina (2.76 nm); seroalbúmina (3.55 nm); alcohol deshidrogenasa (4.61 nm); aldolasa (4.81 nm); ferritina (7.80 nm); y tiroglobulina (8.50 nm).

trones (Laurent y Killander 1964). Se obtuvo un radio de Stokes para la GS de 8.35 nm.

### III.5.5.2. Coeficiente de sedimentación

En la Fig.31 se representan los coeficientes de sedimentación de sustancias patrones en función de los números de las fracciones en que se obtuvieron después de centrifugarlas en un gradiente de viscosidad (Martin y Ames 1961). Al efectuar la representación para la GS de *R. capsulata* E1F1 se obtuvo un valor de  $S_{20,w}$  de 19.2 S.

### III.5.5.3. Peso molecular

La determinación del peso molecular de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 se realizó por tres procedimientos diferentes.

#### III.5.5.3.1. Filtración en gel

El peso molecular se obtuvo representando los valores de  $K_{av}$  de las proteínas, obtenidos en la cromatografía de filtración, en función de los logaritmos de sus pesos moleculares (Fig.32). El peso molecular para la enzima nativa resultó de 660 kDa. Además se obtuvieron los pesos de distintos oligómeros ( 2, 3, 4, 6 y 8 subunidades con 110, 170, 230 y 465 kDa, respectivamente) y el del monómero (56 kDa).

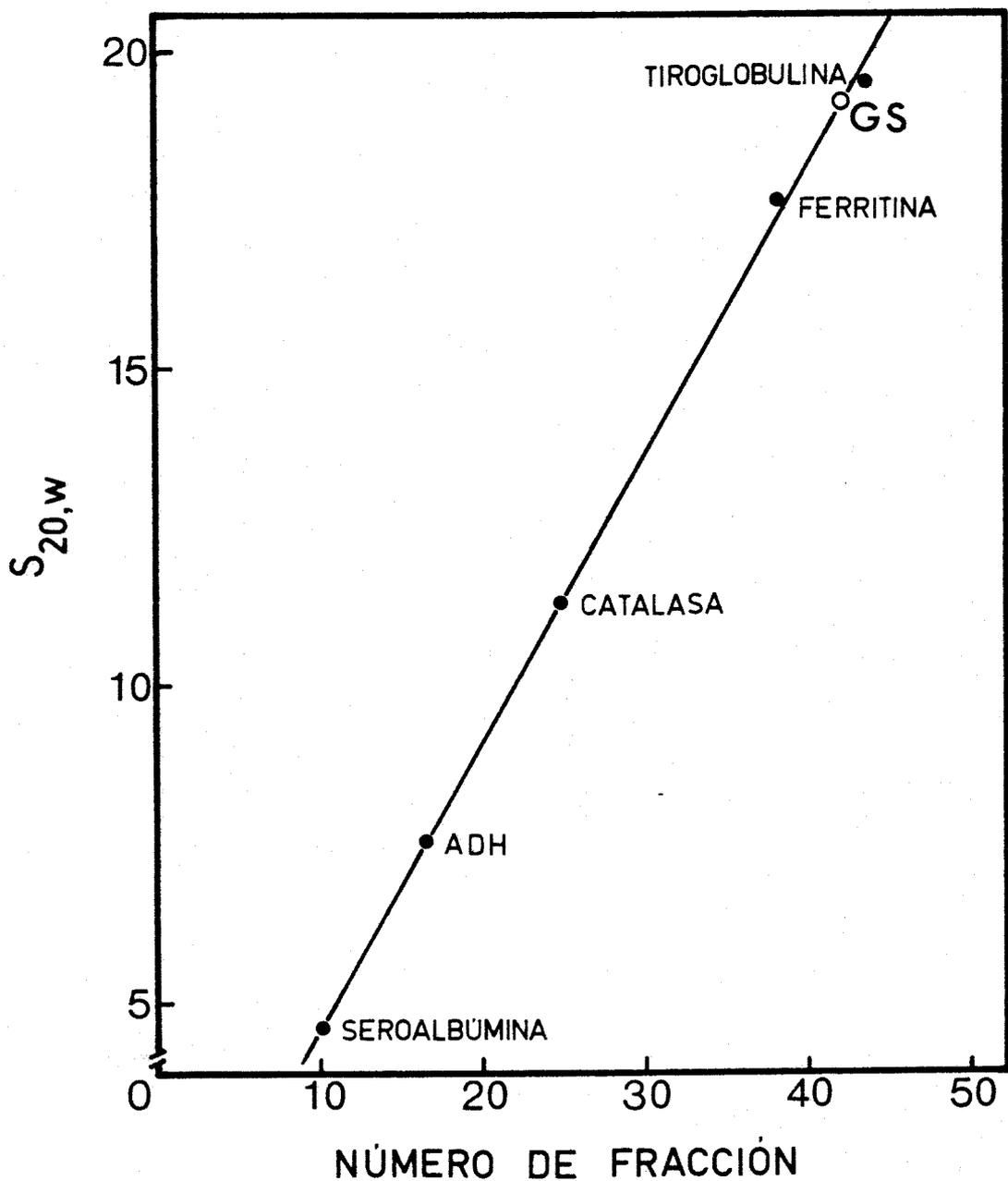


Figura 31.- Determinación del coeficiente de sedimentación de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa.

Se aplicó una muestra de 0.1 ml de GS purificada (25 µg) en un tubo de centrifuga con 4.6 ml de un gradiente de sacarosa entre el 5 y el 20% y se centrifugó a 100 000 *g* durante 6 horas. Como proteínas de S<sub>20,w</sub> conocido se emplearon: seroalbúmina (4.6 S); alcohol deshidrogenasa (7.6 S); catalasa (11.3 S); ferritina (17.6 S); y tiroglobulina (19.4 S).

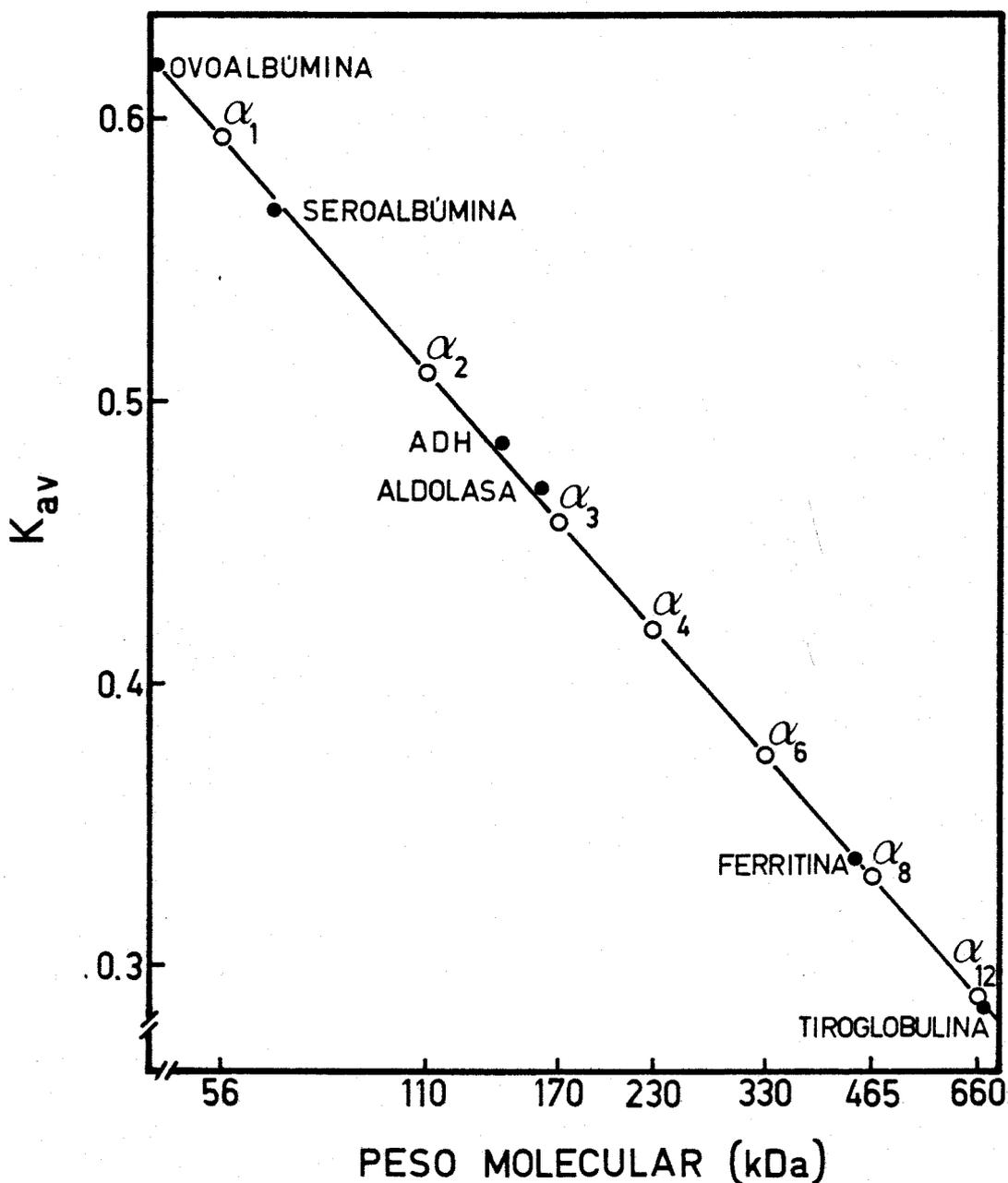


Figura 32.- Pesos moleculares de la glutamina sintetasa nativa de *R. capsulata* E1F1 y de sus diferentes oligómeros obtenidos por cromatografía de filtración en gel.

Las condiciones experimentales son las de la Fig.30. Los diferentes oligómeros se designan por  $\alpha_n$ , donde  $n$  representa el número de subunidades que lo componen. Como patrones se utilizaron: ovoalbúmina (45 kDa); seroalbúmina (67 kDa); alcohol deshidrogenasa (141 kDa); aldolasa (158 kDa); ferritina (440 kDa); y tiroglobulina (669 kDa).

### III.5.5.3.2. Filtración en gel y centrifugación en gradiente de viscosidad

A partir de los valores del radio de Stokes (Fig.30) y del coeficiente de sedimentación (Fig.31) se puede determinar el peso molecular de la enzima empleando la ecuación descrita por Siegel y Monty (1965)

$$M = \frac{6 \pi r_s \eta N S_{20,w}}{1 - \bar{v} \rho}$$

donde  $\bar{v}$  es el volumen específico aparente ( $0.725 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para la proteína),  $\eta$  la viscosidad del medio ( $0.01001 \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para un medio acuoso como el empleado),  $\rho$  es la densidad del mismo ( $0.99823 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  $N$  el número de Avogadro,  $r_s$  el radio de Stokes de la proteína y  $S_{20,w}$  su coeficiente de sedimentación. El peso molecular calculado fué de 661 kDa.

### III.5.5.3.3. Electroforesis en geles de acrilamida

Se empleó el método de Hedrick y Smith (1968) con geles de acrilamida con distinta porosidad. En la Fig.33 se representan, en el recuadro interior, las rectas que se obtienen para cada proteína patrón, así como la de la GS de *R. capsulata* E1F1, estando sus pendientes en relación directa con los pesos moleculares (figura principal). El peso molecular así obtenido fué de 670 kDa.

En la Fig.34 se representan los valores de  $R_f$  de las bandas obtenidas en la electroforesis de la Fig.22 ( 5% de

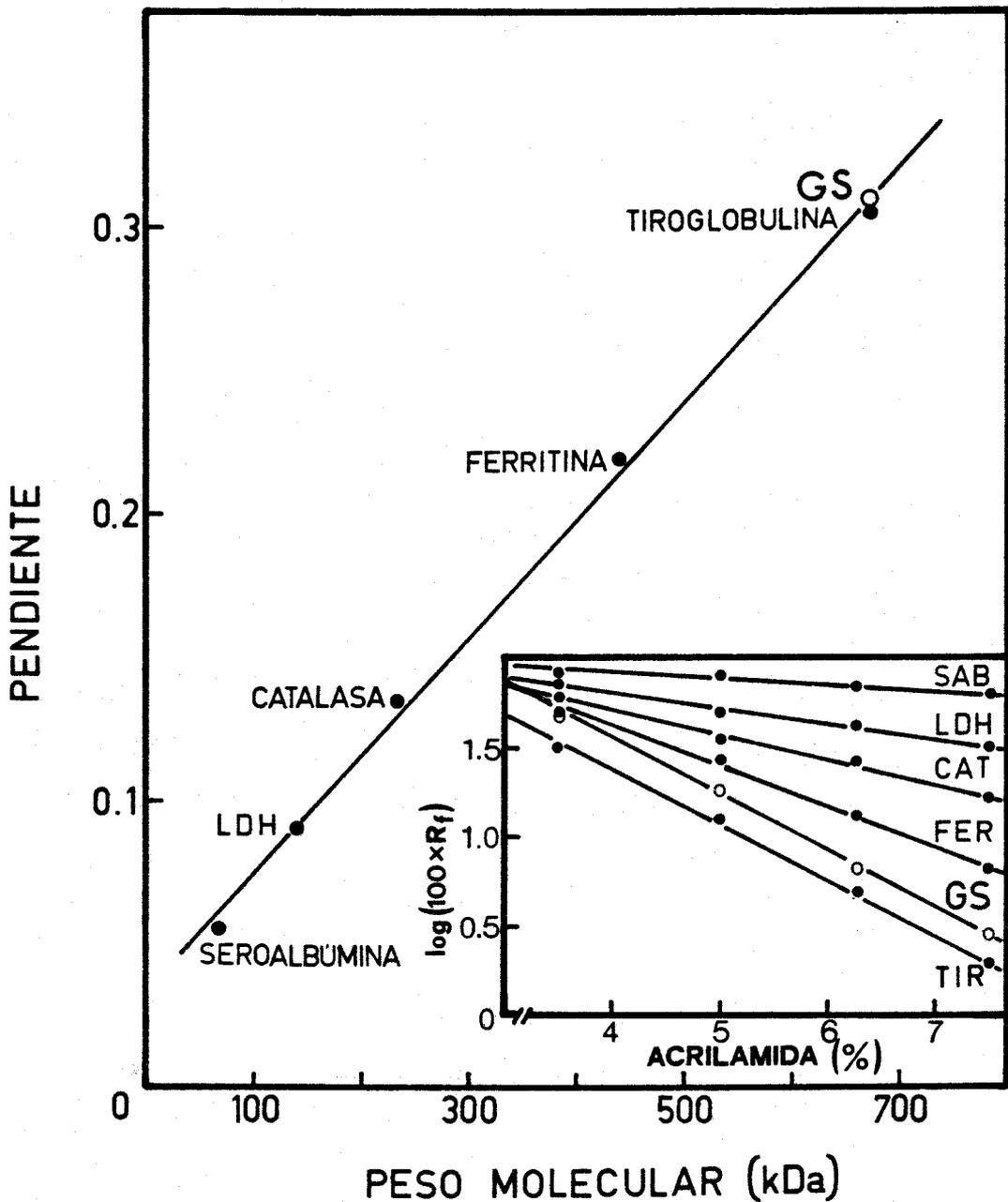


Figura 33.- Determinación del peso molecular de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 por electroforesis en gels con diferente concentración de acrilamida.

En el recuadro interno se muestran los valores obtenidos al desarrollar las electroforesis a las distintas concentraciones de acrilamida. Los valores de las pendientes de las rectas que se obtienen se representan en el eje de ordenadas de la gráfica principal. Como patrones se utilizaron: seroalbúmina (67 kDa); lactato deshidrogenasa (140 kDa); catalasa (232 kDa); ferritina (440 kDa); y tiroglobulina (669 kDa).

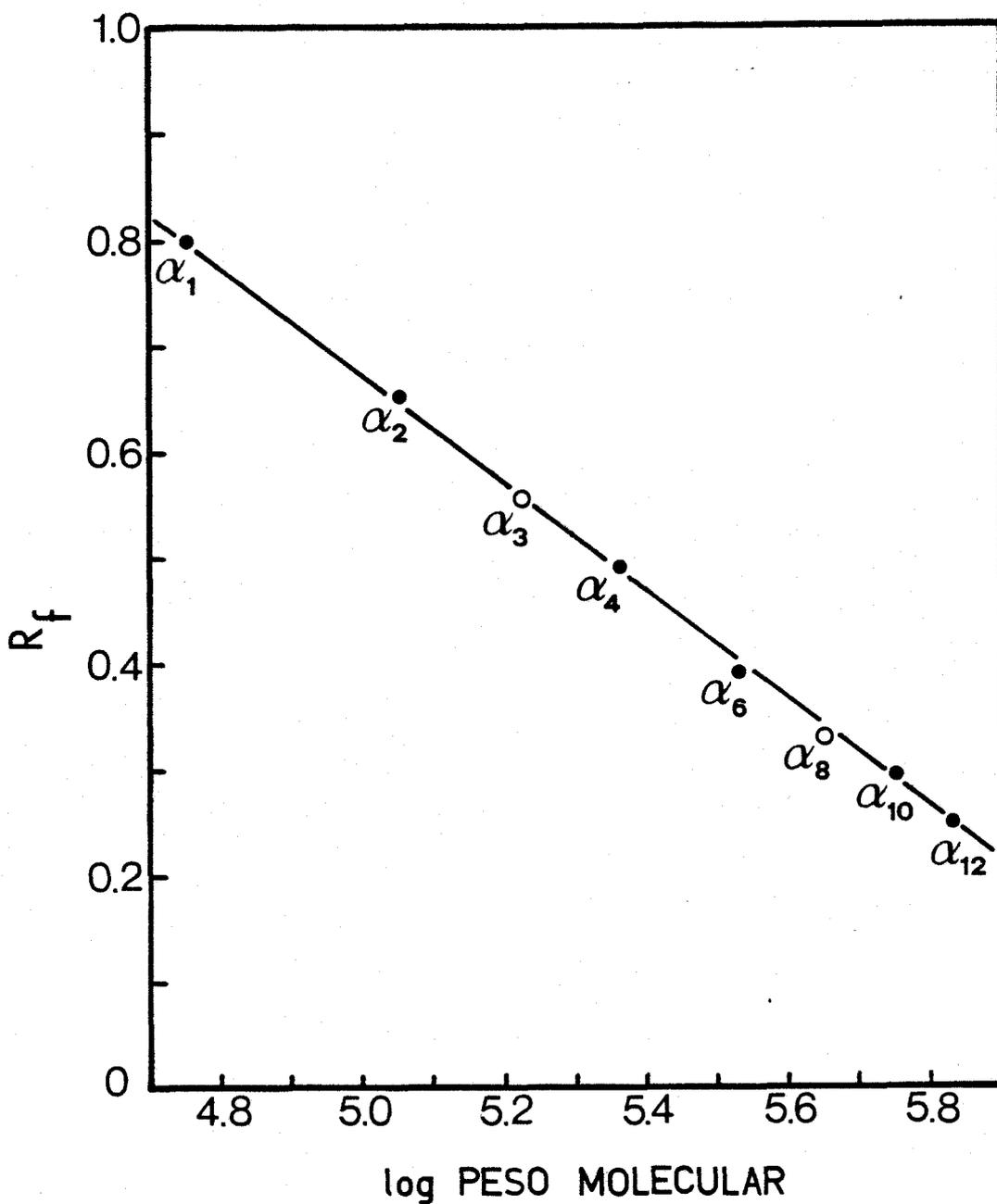


Figura 34.- Pesos moleculares de la glutamina sintetasa nativa de *R. capsulata* E1F1 y de los diferentes oligómeros obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los valores que se emplean son los correspondientes a la electroforesis de la Fig.22 . Se designan como  $\alpha_n$  los distintos oligómeros, siendo  $n$  el número de subunidades de que se componen.

acrilamida) en función de los logaritmos de sus pesos moleculares (suponiendo para la enzima nativa,  $\alpha_{12}$ , un valor de 660 kDa). Los valores se ajustan a una recta, calculándose un peso molecular para la banda de  $R_f$  más alto de 56 kDa, lo que correspondería a la forma monómera. Además se obtienen los tamaños de oligómeros de 2, 3, 4, 6, 8 y 10 subunidades, a las que corresponden valores de 110, 165, 220, 330, 440 y 550 kDa, respectivamente.

#### III.5.5.4. Coeficiente de fricción y fricción relativa

El coeficiente de fricción,  $f$ , da idea de la asimetría de las macromoléculas y es función de su radio de Stokes (Brewer *et al.* 1974):

$$f = 6 \pi \eta r_s$$

Para la GS de *R. capsulata* E1F1 el coeficiente de fricción calculado fué de  $1.577 \cdot 10^{-7} \text{ g s}^{-1}$ .

También es interesante el valor de fricción relativa ( $f/f_0$ ), siendo

$$f_0 = 6 \pi \eta r_0 \quad \text{y} \quad r_0 = \left( \frac{3 M \bar{v}}{4 \pi N} \right)^{1/3}$$

los valores del coeficiente de fricción y del radio de la proteína, respectivamente, si ésta fuera globular. La fricción relativa es (Brewer *et al.* 1974):

$$f / f_0 = \frac{r_s}{\left( \frac{3 M \bar{v}}{4 \pi N} \right)^{1/3}}$$

El valor de fricción relativa que se obtiene para la GS de *R. capsulata* E1F1 es de 1.45.

### III.5.6. Grupos -SH de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

La determinación de los grupos -SH de la enzima se llevó a cabo titulando una solución de pHMB de concentración conocida, con otra de glutamina sintetasa pura, midiendo el aumento de la absorbencia a 255 nm (cfr. II.3.8.). Se requirieron 0.345 nmol de enzima para la valoración de 38nmol de pHMB (Fig.35), equivalentes a 110 nmol pHMB / nmol GS, es decir,  $9 \pm 0.2$  grupos -SH por cada una de las 12 subunidades de la enzima

En la Tabla XIV se resumen todas las propiedades físico-químicas estudiadas de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

### III.6. ESTUDIOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA EN *R. capsulata* E1F1.

En el apartado III.1.3.4. se describió la variación de los niveles de actividad GS cuando la fuente de nitrógeno del medio de cultivo era  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NH}_4^+$ . En los apartados que siguen se van a estudiar los efectos de diversos compuestos sobre la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 y su estado de adenilación, de interés para el sistema regulador de la asimilación de amonio en esta bacteria. También se va a estu-

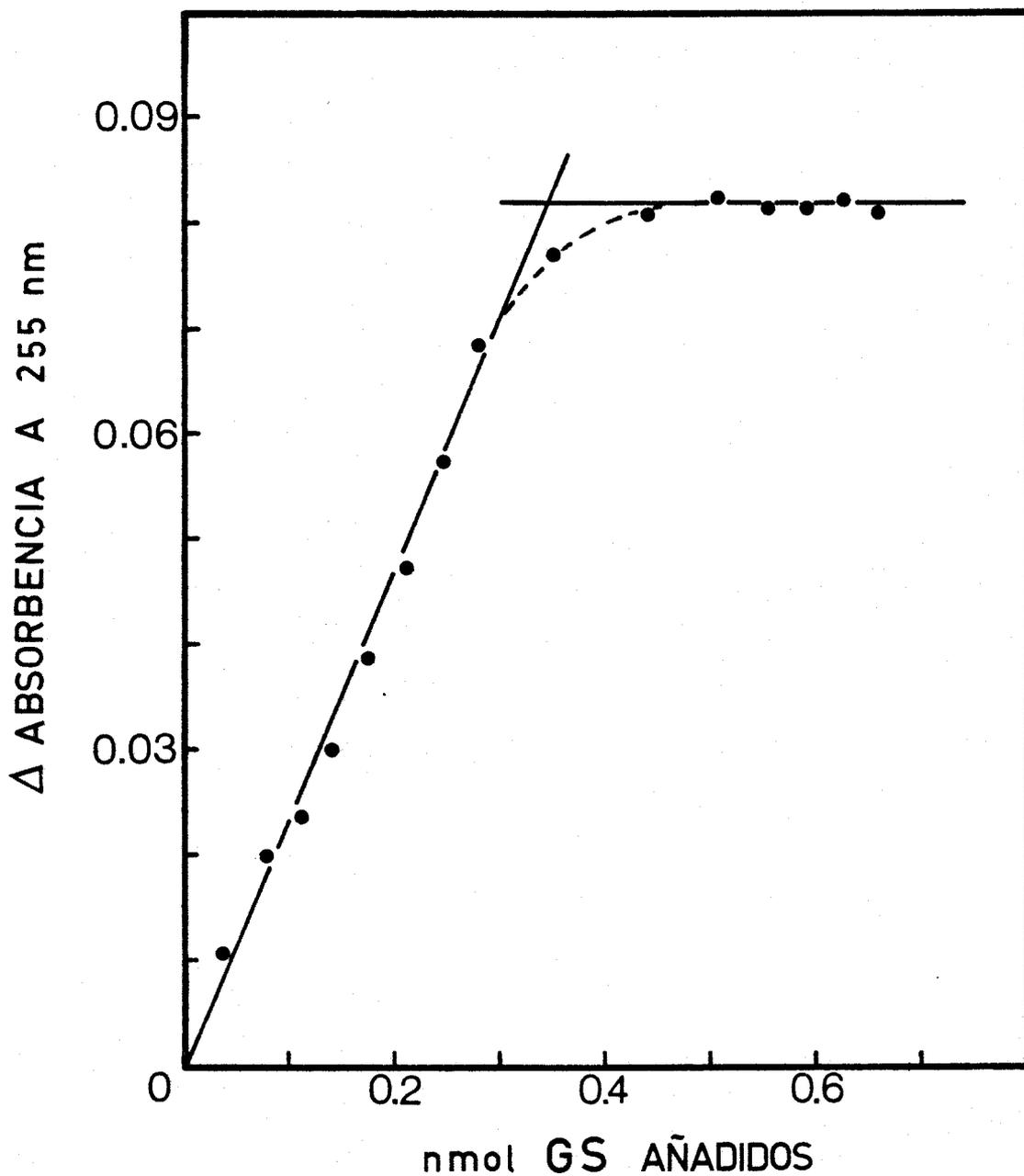


Figura 35.- Titulación de los grupos  $-SH$  de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

Se tituló una solución que contenía 38 nmoles de pMBB con otra de enzima purificada (1.72 nmol/ml). El proceso se siguió midiendo el incremento de la absorbencia a 255 nm. Los datos que se muestran son los obtenidos al corregirlos debido a la dilución. Los detalles de la titulación se indican en Materiales y Métodos.

TABLA XIV

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA PURIFICADA DE *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1

---

Radio de Stokes (nm)	8.35
Coefficiente de sedimentación (S)	19.20
Cociente friccional ( $f / f_0$ )	1.43
Peso molecular / id. de la subunidad (kDa)	
- filtración en gel	660 / 55
- " y centrifug. en grad. de viscosidad	661 / 55
- electrofor. en geles con difer. % de acrilamida	670 / 56
Grupos -SH por subunidad	9
Temperatura óptima (activ. transferasa) (°C)	43
Energía de activación (kJ / mol)	21.6
$Q_{10}$ (30 - 40 °C)	1.32
Actividad específica (U/mg)	
- transferasa	167
- biosintética	6.7
- transferasa / biosintética	24.9
Número de cambio ( $s^{-1}$ )	
- activ. transferasa	2035
- activ. biosintética	70
Km actividad transferasa (mM)	
- L-glutamina	12
- $NH_2OH$	6
- ADP	0.01
Km actividad biosintética	
- L-glutamato	6.5
- $NH_4^+$	0.3
- ATP	0.5
pH óptimo (activ. transferasa)	
- forma adenilada	6.5
- forma desadenilada	7.5

---

diar el efecto de la oscuridad sobre dicha actividad enzimática y sobre el nivel de crecimiento de las células.

### III.6.1. *Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el grado de adenilación de la glutamina sintetasa*

En la Fig.36 se observa la variación del grado de adenilación de la GS, medida *in situ*, en células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en medios con distintas fuentes de nitrógeno. En los medios con formas oxidadas de nitrógeno o extracto de levadura la enzima estaba desadenilada en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que en los medios con L-glutamato y L-alanina la disminución del grado de adenilación de la GS comenzó con un desfase de unas 10 horas. En L-glutamina el grado de adenilación de la enzima prácticamente no varió a lo largo del crecimiento y se mantuvo en torno a 8. En amonio la adenilación fué aumentando durante la fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar un valor de 10, volviendo a bajar hasta 8 en la fase estacionaria.

La correlación que se encontró entre la altura de los cohetes obtenidos por inmunolectroforesis cuantitativa y la actividad total de la enzima ( adenilada y desadenilada ) fué muy buena cuando se emplearon preparaciones parcialmente purificadas de aquella (cfr. II.2.1.2.). Esta correlación se mantuvo en todos los medios de cultivo con las diferentes fuentes de nitrógeno (Fig.37).

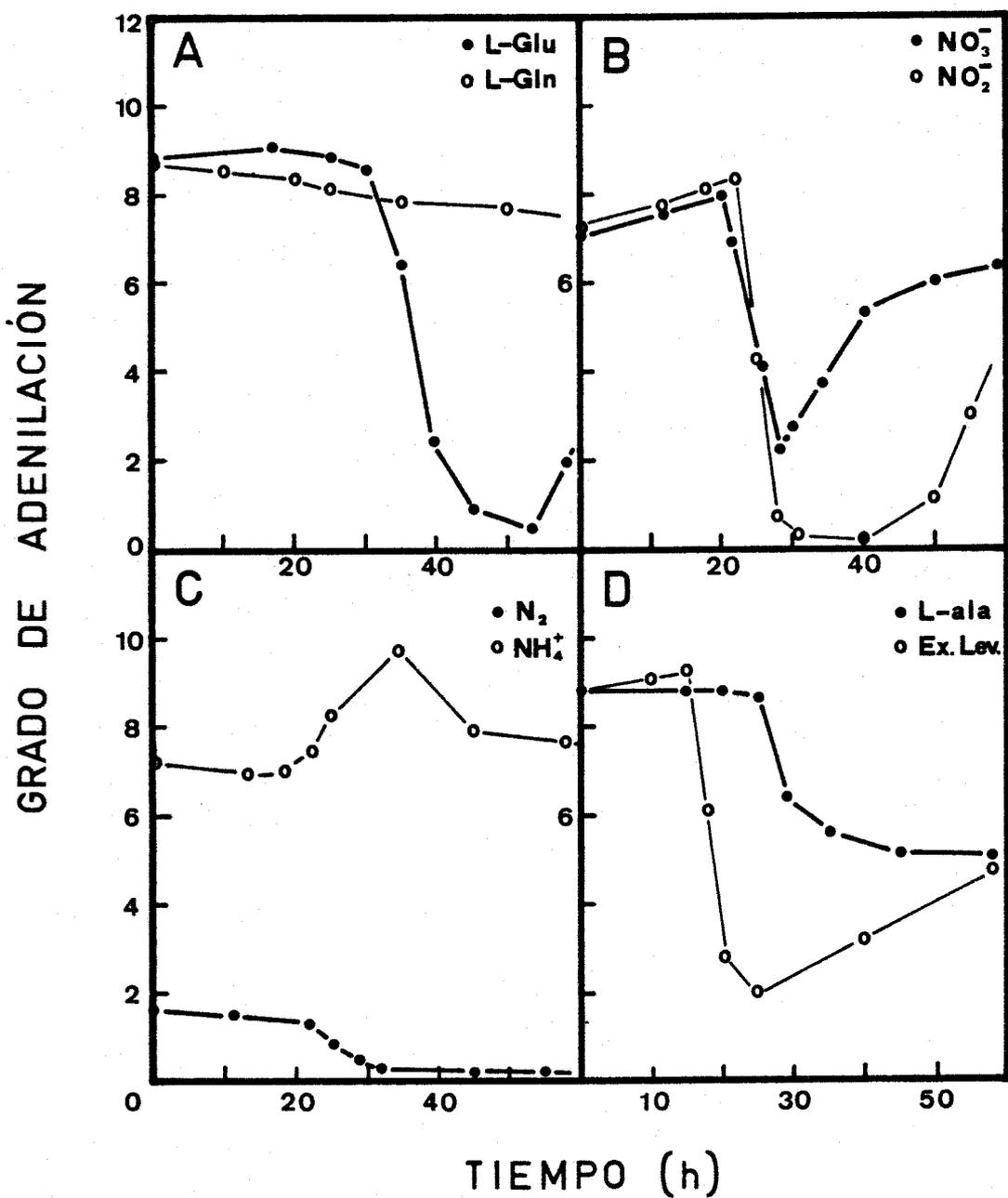


Figura 36.- Variación del grado de adenilación de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1 durante el crecimiento.

Las células se cultivaron en condiciones fotosintéticas con las distintas fuentes de nitrógeno que se indican en la figura. El grado de adenilación se determinó como se especifica en Materiales y Métodos.

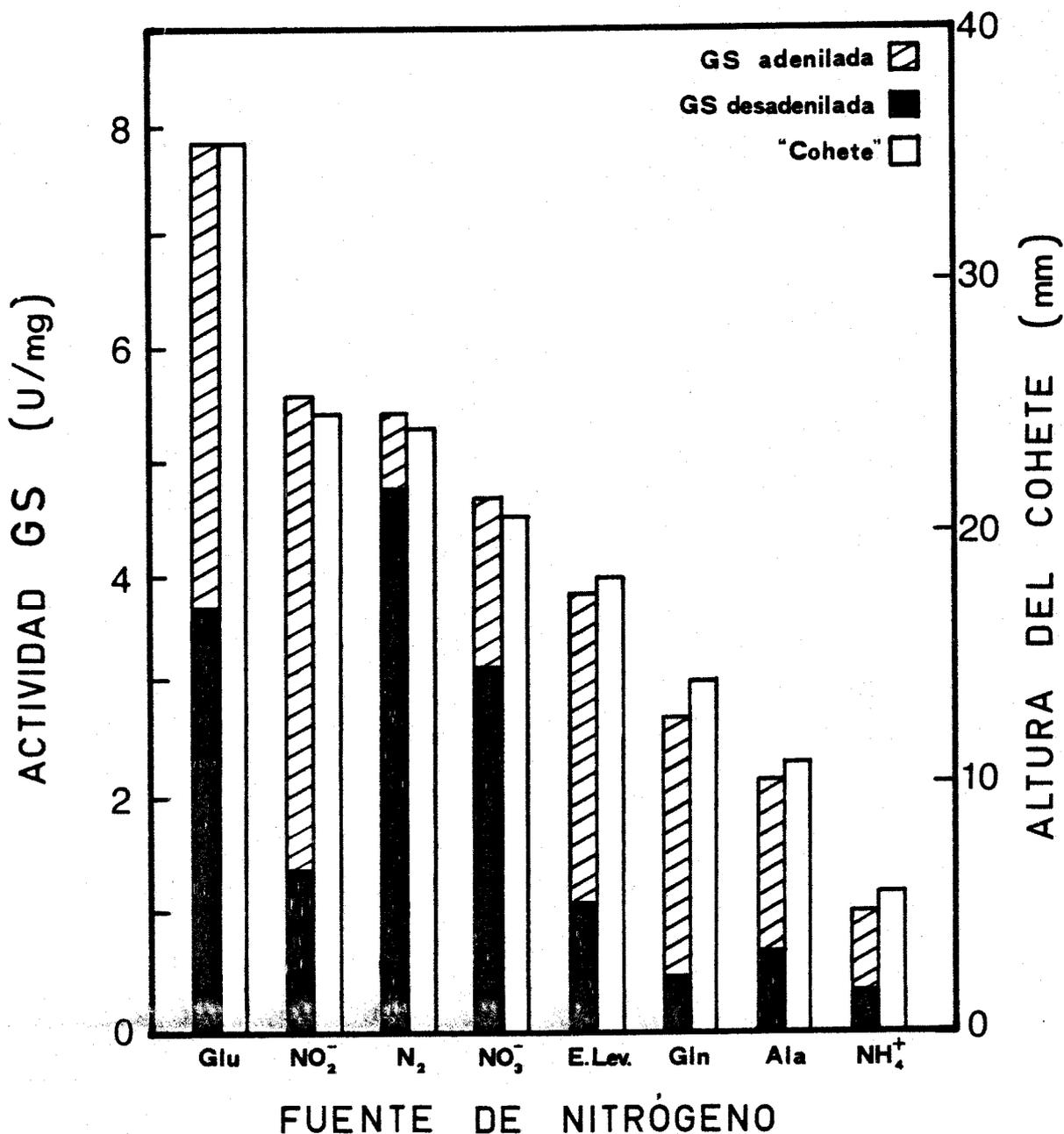


Figura 37.- *Correlación entre la actividad transferasa y la concentración intracelular de glutamina sintetasa de células de R. capsulata E1F1 cultivadas fototróficamente con diferentes fuentes de nitrógeno.*

Se utilizaron preparaciones de GS parcialmente purificadas de células cultivadas en las distintas fuentes de nitrógeno y recogidas a diferentes tiempos de cultivo. Las proporciones de GS adenilada y desadenilada y las cantidades de enzima (por inmunoelectroforesis cuantitativa) se determinaron como se describe en Materiales y Métodos.

### III.6.2. *Regulación in vivo de la actividad glutamina sintetasa por amonio y L-alanina*

La adición de amonio o L-alanina a cultivos de células de *R. capsulata* E1F1 con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno provocó una disminución en los niveles de actividad GS, en relación con los del cultivo control sin adiciones (Fig.38 A), aunque el crecimiento se aceleró en aquellos medios respecto del que sólo tenía  $\text{NO}_3^-$  ( Resultados no mostrados ). Además de este efecto sobre la actividad total, también tuvo lugar un aumento del grado de adenilación de la GS, que fué más marcado en el medio al que se había añadido amonio, llegando la enzima a estar casi totalmente adenilada (Fig.38 B).

El análisis de inmunolectroforesis cuantitativas de las GS obtenidas en los tres medios anteriores mostró que no existían diferencias apreciables entre ellas, manteniéndose en todo momento la correlación entre la actividad total y la cantidad de esta proteína detectada en los inmunoprecipitados ( Resultados no mostrados ).

### III.6.3. *Inactivación in vivo de la glutamina sintetasa por MSX*

Al añadir MSX 50  $\mu\text{M}$  a células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente en medios con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, el crecimiento se inhibió durante unas 6 horas, reanudándose éste luego con un tiempo de generación semejante al del cultivo control (Fig.39). Simultáneamente

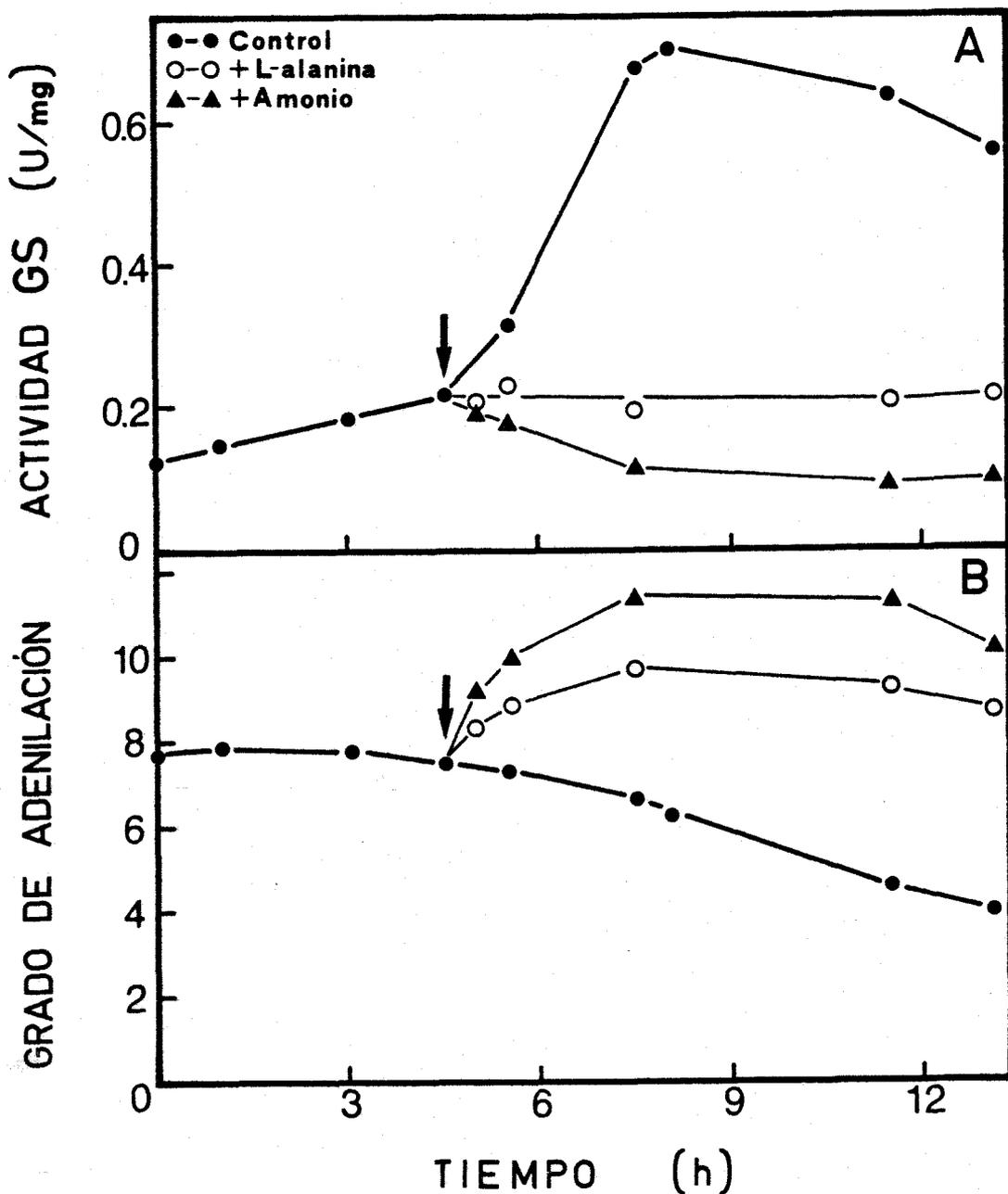


Figura 38.- Efectos del amonio y de la L-alanina sobre la actividad glutamina sintetasa y su grado de adenilación, en células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $\text{KNO}_3$ .

A diferentes cultivos creciendo exponencialmente con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, se añadió  $\text{NH}_4^+$  o L-alanina 5 mM al tiempo indicado por la flecha. A diferentes tiempos, eliminados estos productos por centrifugación, se determinó la actividad transferasa total y dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  y se calculó el grado de adenilación como se describe en Materiales y Métodos.

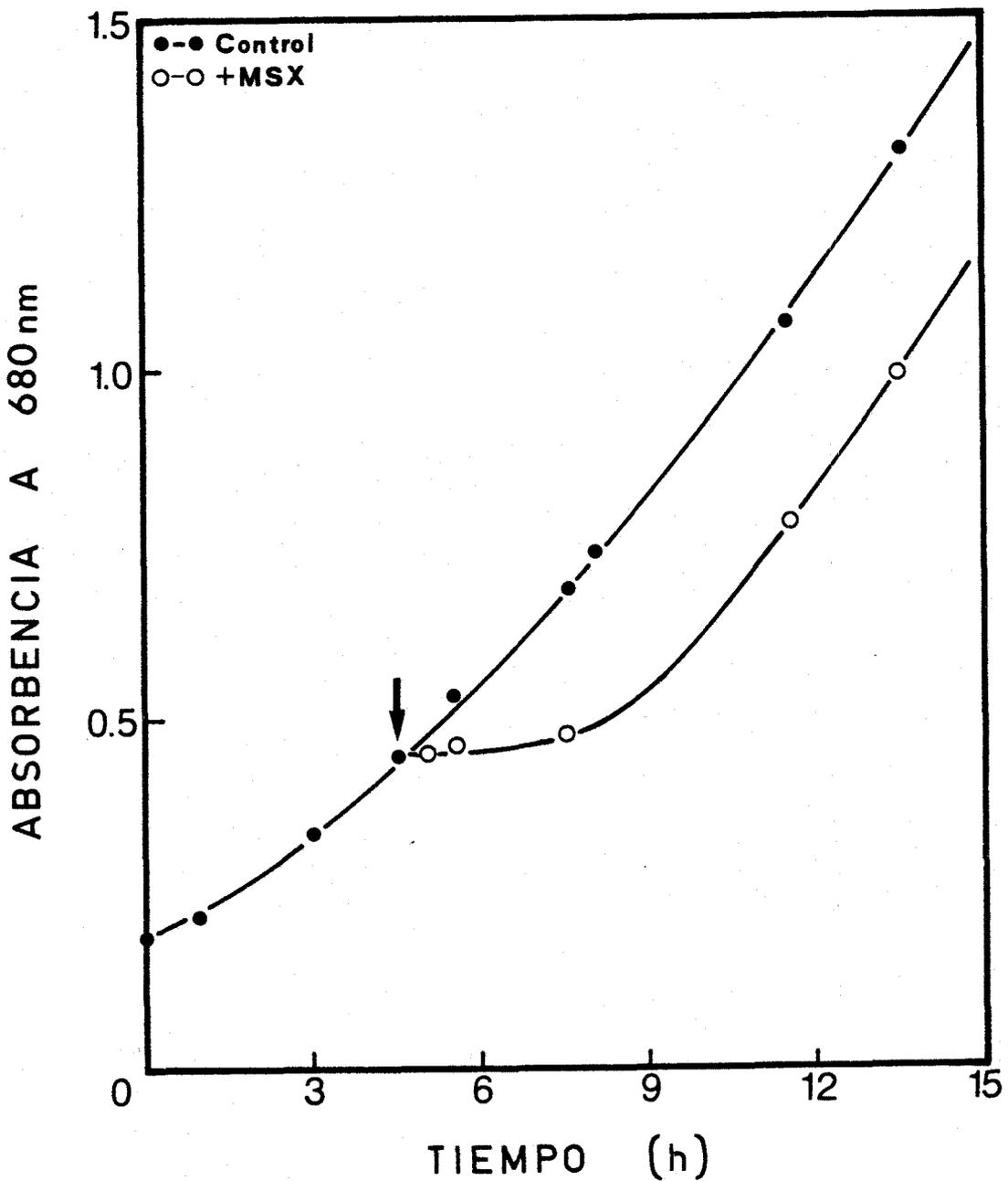


Figura 39.- Efecto del MSX sobre el crecimiento de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $KNO_3$ .

Se determinó el crecimiento en dos cultivos paralelos de células de *R. capsulata* E1F1 en condiciones fotosintéticas y con  $KNO_3$  como fuente de nitrógeno, a uno de los cuales se le añadió MSX  $50 \mu M$  en el momento indicado en la gráfica por la flecha.

se observó una disminución de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el medio, así como la excreción de amonio al mismo hasta concentraciones superiores a 1 mM (Resultados no mostrados).

La actividad GS de las células del medio con MSX se hizo prácticamente nula en menos de 1 hora y se mantuvo en valores próximos a 0 hasta que se reanudó el crecimiento, aumentando entonces, pero sólo hasta un 15% de la actividad del control sin MSX (Fig.40 A) .

Se purificó parcialmente la GS de cada una de las fracciones obtenidas en el experimento anterior, utilizando el procedimiento de sonicación y ultracentrifugación descrito en el apartado II.2.1.2., y se procedió a examinarlas por inmunolectroforesis cuantitativa. En la Fig.40 se observa el gran paralelismo que existe, para la GS de células cultivadas en medios con nitrato únicamente, entre la variación de su actividad específica y la de la altura de los cohetes obtenidos en las respectivas inmunolectroforesis. Sin embargo, en las preparaciones que provenían de células en medios con MSX, mientras la actividad GS disminuía hasta niveles muy bajos, las alturas de los cohetes aumentaban progresivamente, siendo en todo momento superiores a las alturas del cultivo control.

#### III.6.4. *Efecto de la oscuridad sobre el crecimiento y la actividad glutamina sintetasa*

En la Fig.41 se muestran los perfiles de crecimiento y de actividad GS de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas

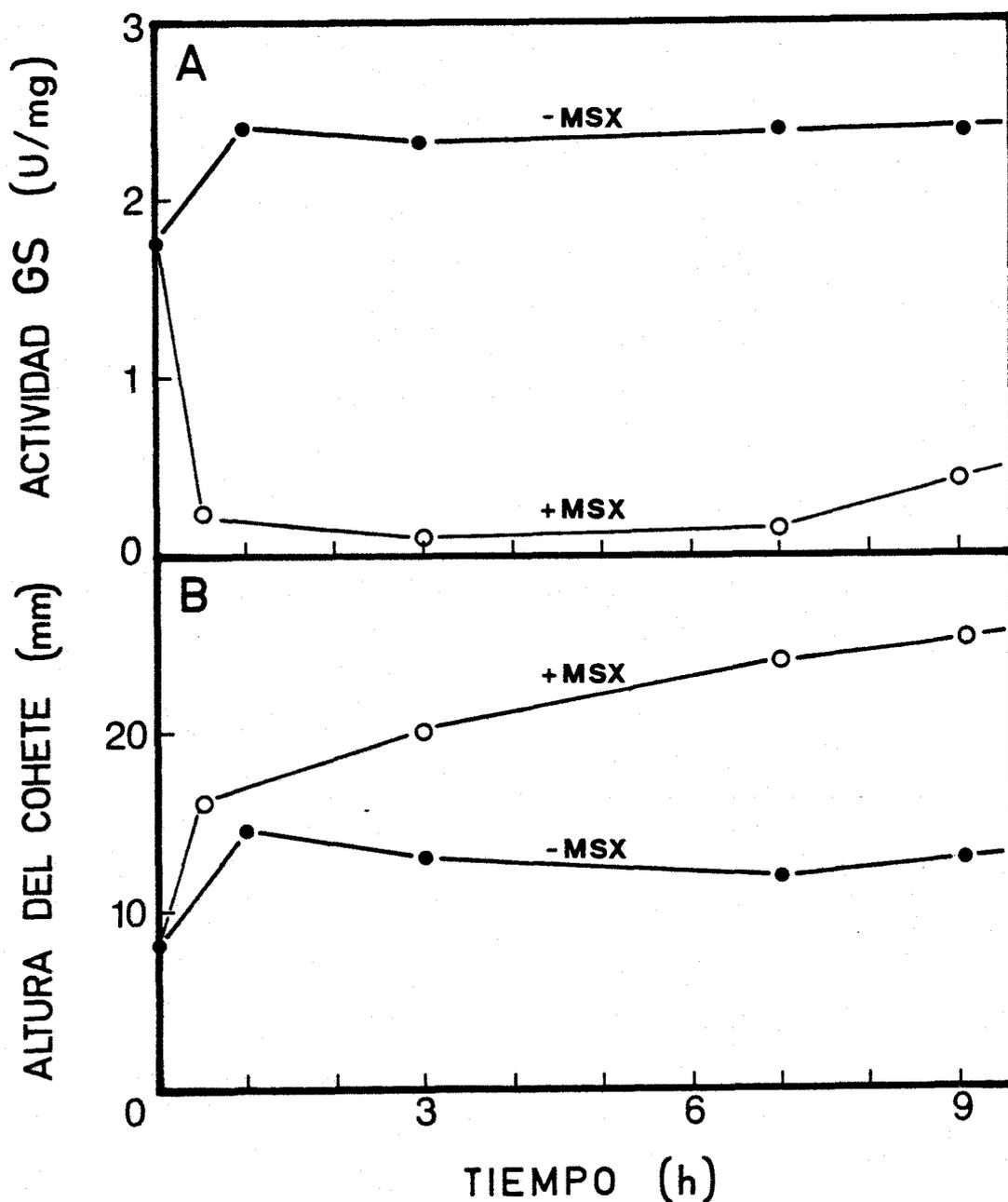


Figura 40.- Efecto del MSX sobre la actividad y la concentración intracelular de glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1.

Se utilizaron preparaciones de GS parcialmente purificadas obtenidas en los cultivos con y sin MSX añadido de la Fig.39. La actividad transferasa total y la cantidad intracelular de enzima (por inmuno electroforesis cuantitativa) se determinaron según se describe en Materiales y Métodos.

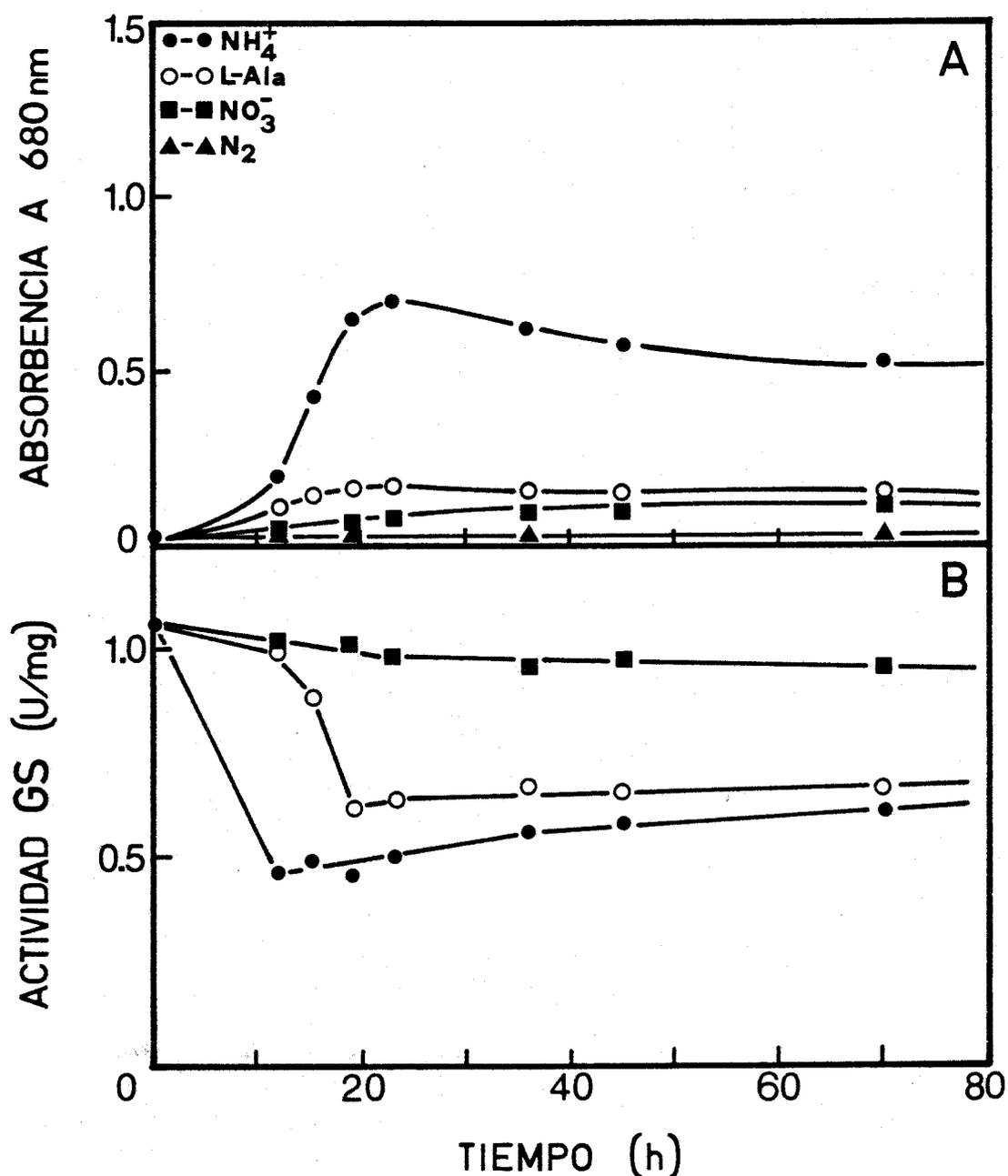


Figura 41.- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa de células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas en aerobiosis y oscuridad.

Las células, procedentes de cultivos fotosintéticos con  $\text{KNO}_3$ , se inocularon en medios RCV con las diferentes fuentes de nitrógeno que se indican en la figura a la concentración de 1 g/l, excepto en el caso del dinitrógeno en que se utilizó el  $\text{N}_2$  disuelto en el medio (15 mg/l a 30°C). En cada uno de los puntos se determinó el crecimiento y la actividad transferasa total de la GS.

en aerobiosis y oscuridad con distintas fuentes de nitrógeno. Sólo se obtuvo un crecimiento apreciable en medios con  $\text{NH}_4^+$ . En los medios con  $\text{NO}_3^-$  o L-alanina como fuente de nitrógeno también hubo crecimiento, aunque fué 5 ó 6 veces menor que con amonio. En esas condiciones las células no crecieron con  $\text{N}_2$ . En el medio con  $\text{NO}_3^-$  la concentración de este ión permaneció prácticamente constante, aunque hubo un ligero aumento de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el medio (Resultados no mostrados).

El nivel de la actividad transferasa de la GS no se afectó por la oscuridad en el medio con  $\text{KNO}_3$ . En el de L-alanina la actividad se mantuvo en las primeras 12 horas, disminuyendo rápidamente hasta un 60% de la inicial y manteniéndose luego a este nivel. Con L-glutamato se obtuvo el mismo comportamiento (Resultados no mostrados). En medios con amonio la actividad disminuyó desde el primer momento hasta alcanzar un 45% de la inicial a las 10 horas, recuperándose lentamente durante el período de crecimiento hasta llegar al 55% (Fig.40 B). La actividad total GS permaneció constante cuando células de *R. capsulata* E1F1 cultivadas fototróficamente con  $\text{KNO}_3$  se transfirieron a condiciones de oscuridad y anaerobiosis (Resultados no mostrados).

#### III.6.5. *Efecto de los distintos aminoácidos sobre la actividad glutamina sintetasa*

En la Tabla XV se presenta el efecto de distintos L-aminoácidos sobre las actividades transferasa y biosinté-

TABLA XV

EFFECTO DE DIFERENTES AMINOÁCIDOS SOBRE LAS ACTIVIDADES CATALIZADAS POR LA GLUTAMINA SINTETASA DE *R. capsulata* E1F1.

L-aminoácido	A c t i v i d a d	
	Transferasa ( % )	Biosintética ( % )
Glutamina	100	100
Glutamato	94	100
Treonina	99	100
Cisteina	102	97
Leucina	95	96
Metionina	94	94
Isoleucina	89	100
Histidina	87	99
Prolina	81	99
Asparragina	90	92
Lisina	90	92
Fenilalanina	85	94
Valina	91	85
Serina	73	87
Aspartato	83	82
Glicina	62	82
Alanina	20	79

Las actividades transferasa y biosintética se determinaron como se describe en Materiales y Métodos, utilizando preparaciones de la enzima pura (2 y 6  $\mu$ g respectivamente), incluyendo además en la mezcla de reacción los aminoácidos indicados en la Tabla a la concentración final de 5 mM. El 100% de actividad corresponde a 134.5 y a 5.4 U/mg para las actividades transferasa y biosintética, respectivamente.

tica de la GS purificada de células de *R. capsulata* E1F1. La L-alanina inhibió fuertemente ambas actividades, disminuyendo la actividad transferasa en un 80%. También la L-glicina y la L-serina fueron inhibidores de ambas actividades, aunque menos drásticos. El L-aspartato produjo una inhibición semejante sobre las dos actividades (17 y 18% respectivamente). Además la L-prolina, la L-fenilalanina y la L-isoleucina inhibieron entre un 18 y un 11% la actividad transferasa, pero no ejercieron ningún efecto apreciable sobre la actividad biosintética, que resultó más afectada por la L-valina.

La inhibición ejercida sobre la actividad biosintética por los L-aminoácidos alanina, aspartato, glicina, serina y valina, a concentración 5 mM, se presenta en la Fig. 42. La inhibición, de tipo no competitivo respecto al glutamato, fué mayor con el L-aspartato, llegando al 44% cuando la concentración de L-glutamato era 5 mM. El grado de adenilación de la GS utilizada en los experimentos de inhibición era 8.

#### III.6.6. *Efecto del $Mn^{2+}$ sobre la actividad biosintética de la glutamina sintetasa*

La actividad biosintética de la GS purificada de células de *R. capsulata* E1F1 ( $\bar{n} = 7$ ) aumentó con la concentración de  $Mn^{2+}$  añadido a la mezcla de ensayo, siendo máxima a una concentración 17 mM de  $Mn^{2+}$ . La actividad disminuyó lentamente al aumentar más la concentración de dicho ión,

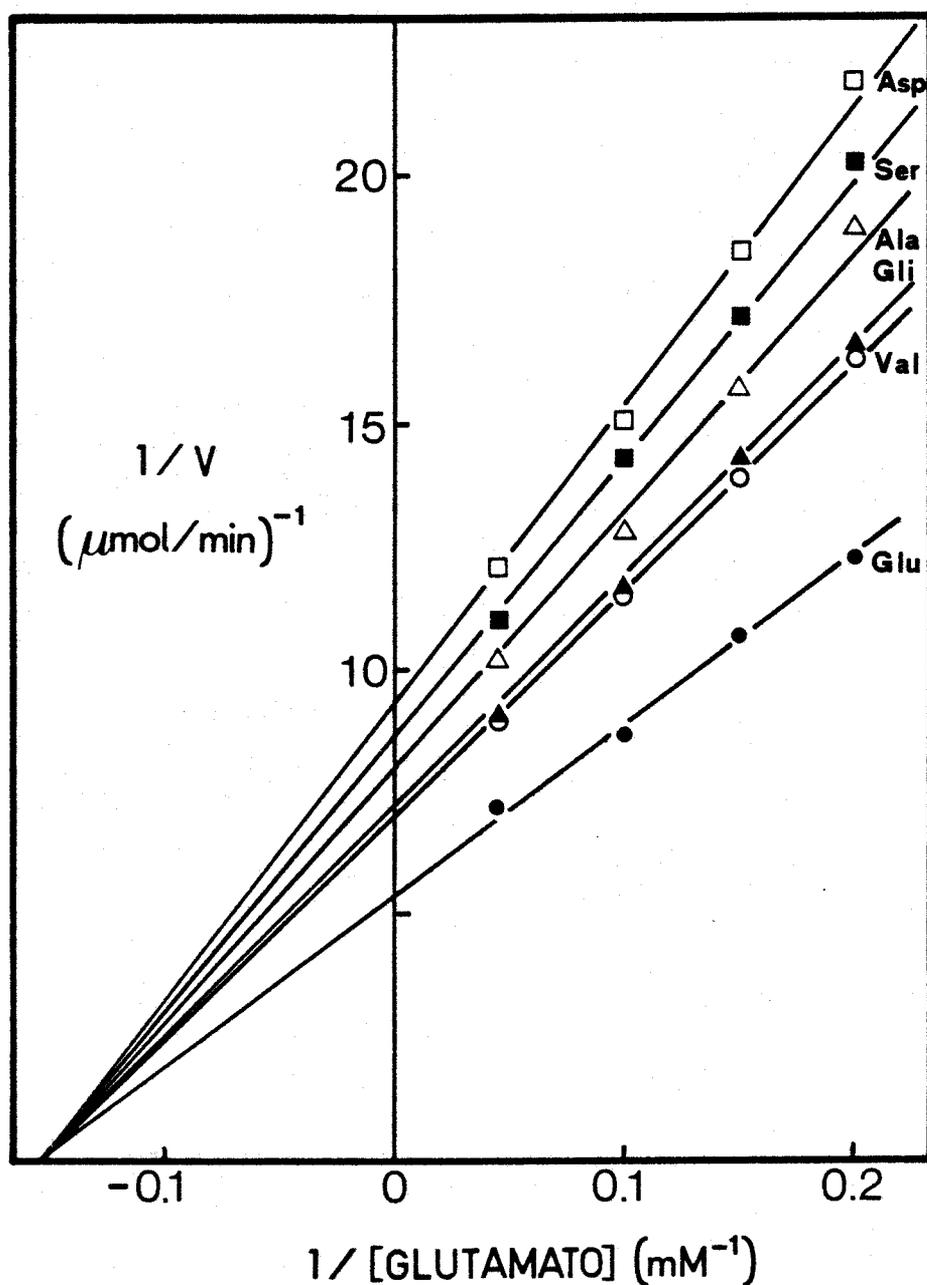


Figura 42.- Inhibición por distintos aminoácidos de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

Se utilizó el ensayo biosintético de la GS descrito en Materiales y Métodos, pero variando la concentración de L-glutamato como se indica en la figura y en presencia de cada aminoácido a una concentración 5 mM. La cantidad de enzima que se empleó en cada ensayo fué de 6  $\mu\text{g}$ .

aunque fué siempre mayor que la del ensayo estándar, sin  $Mn^{2+}$  (Fig.43). La concentración de ATP en la mezcla de ensayo era 15 mM, por lo que la relación  $Mn^{2+}/ATP$  en el punto de mayor actividad resultó ser de 1.13 .

### III.6.7. *Efectos antagónicos del pHMB y del DTE sobre la actividad transferasa de la glutamina sintetasa*

En la Fig.44 se muestra la inhibición por el pHMB de la actividad transferasa de la GS de *R. capsulata* E1F1. Una concentración 0.1 mM de inhibidor produjo una disminución de la actividad de un 30%, siendo del 70% a concentración 1 mM del inhibidor y del 97% con 10 mM de pHMB. La  $K_i$  que se calculó para esta inhibición no competitiva fué de 235  $\mu M$  (Fig. 45).

Este efecto del pHMB se revirtió parcialmente cuando se añadió DTE (Fig.46). En la Fig.47 se observa el efecto del DTE sobre preparaciones enzimáticas tratadas y sin tratar con pHMB 0.5 mM. Hasta una concentración 0.1 mM, el DTE reactivó en más del 40% a la GS de preparaciones que habían perdido el 90% de la actividad al tratarlas con pHMB. La adición de DTE a concentraciones superiores (hasta 0.5 mM) sólo produjo una reactivación del 50%, debido a que, como hemos observado, a esas concentraciones el DTE ejerce también un efecto inactivador bastante potente.

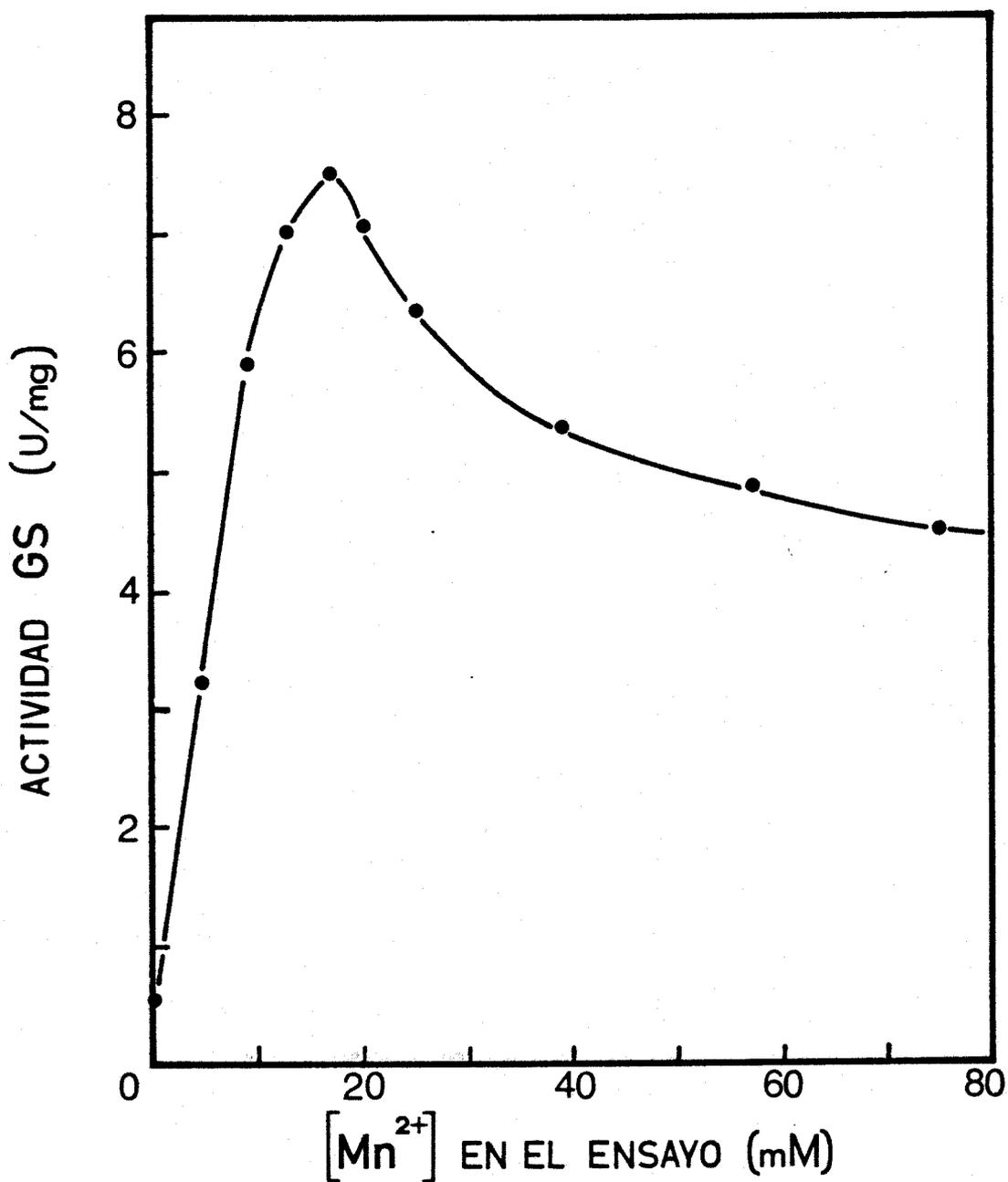


Figura 43.- Efecto del  $Mn^{2+}$  sobre la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

El  $MnCl_2$  se añadió a la mezcla del ensayo biosintético de la GS descrito en Materiales y Métodos, en sustitución del  $MgCl_2$ . Se utilizaron preparaciones enzimáticas que contenían 1.5  $\mu g$  de enzima purificada ( $\bar{n} = 7.0$ ).

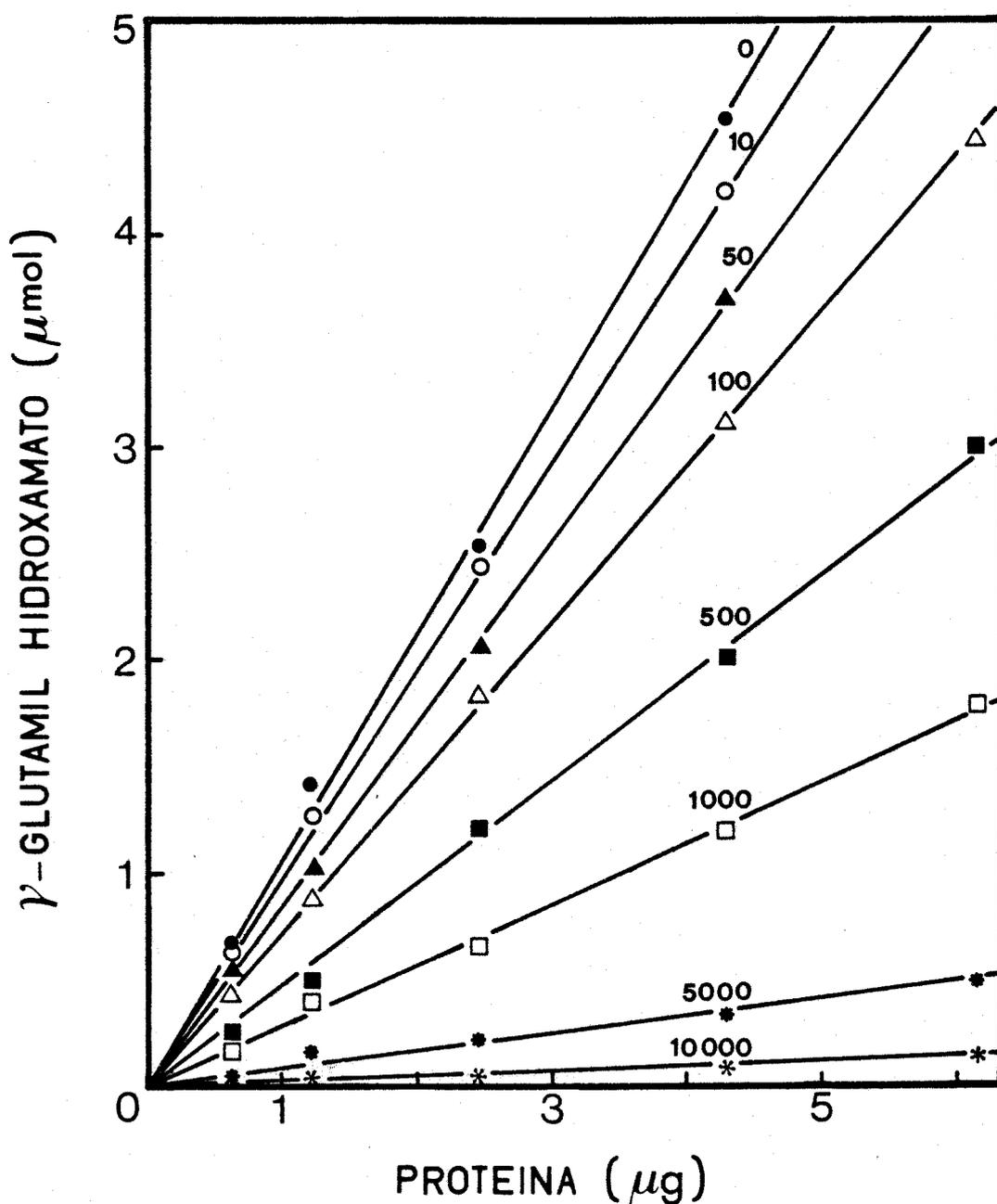


Figura 44.- Efecto del pHMB sobre la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

Preparaciones de GS con distintas cantidades de proteína purificada (de 0.61 a 6.15 μg) se incubaron 15 minutos con pHMB a las concentraciones μM que se indican en la figura, y al cabo de dicho tiempo se les determinó la actividad transferasa como se describe en Materiales y Métodos.

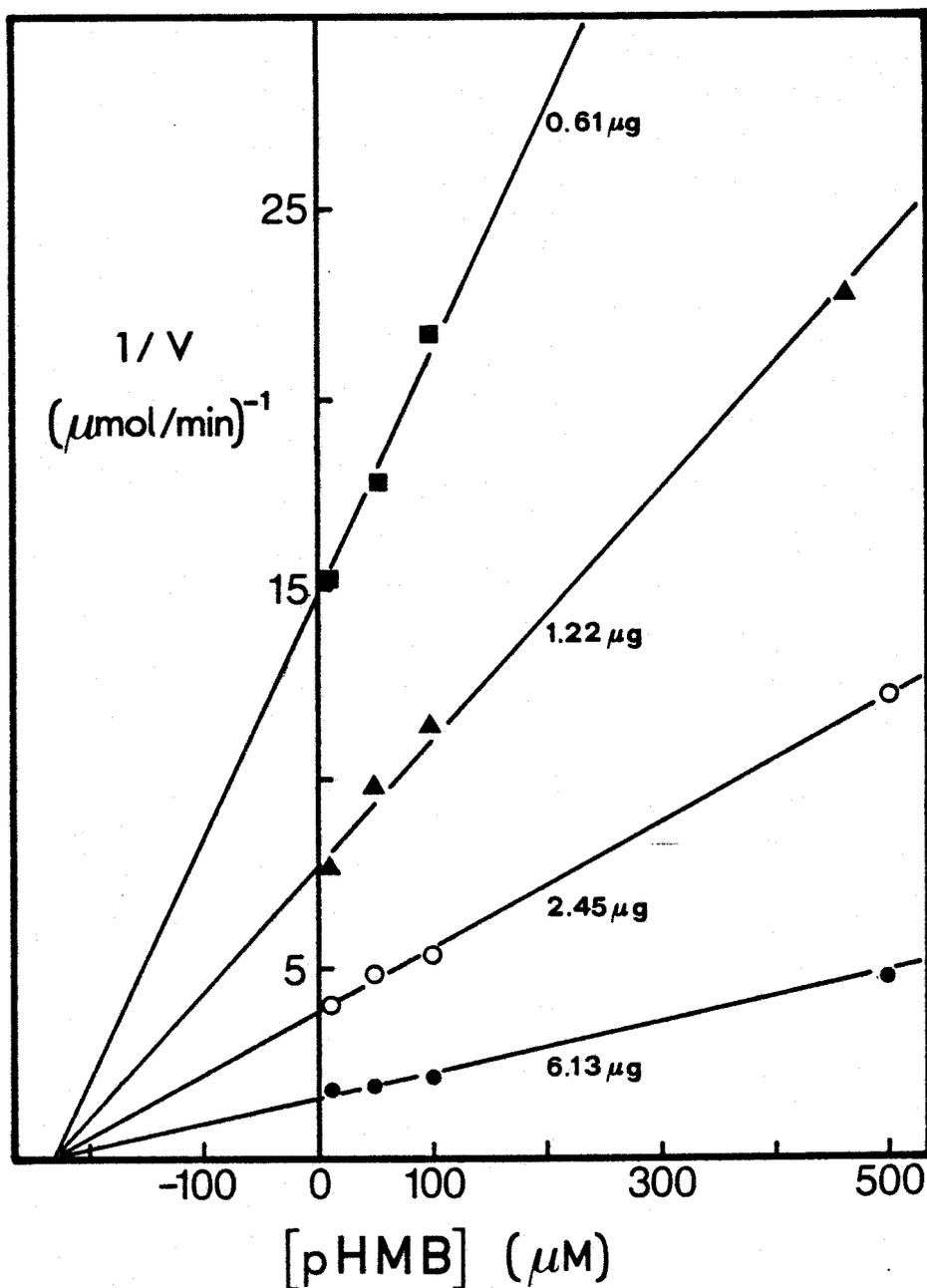


Figura 45.- Representación de Dixon para el efecto del pHMB sobre la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* EIF1.

Las condiciones del experimento son las de la Fig.44. Cada recta está obtenida para la cantidad de enzima ( $\mu\text{g}$ ) que se indica en la figura, a concentraciones saturantes de todos los sustratos de la actividad transferasa.

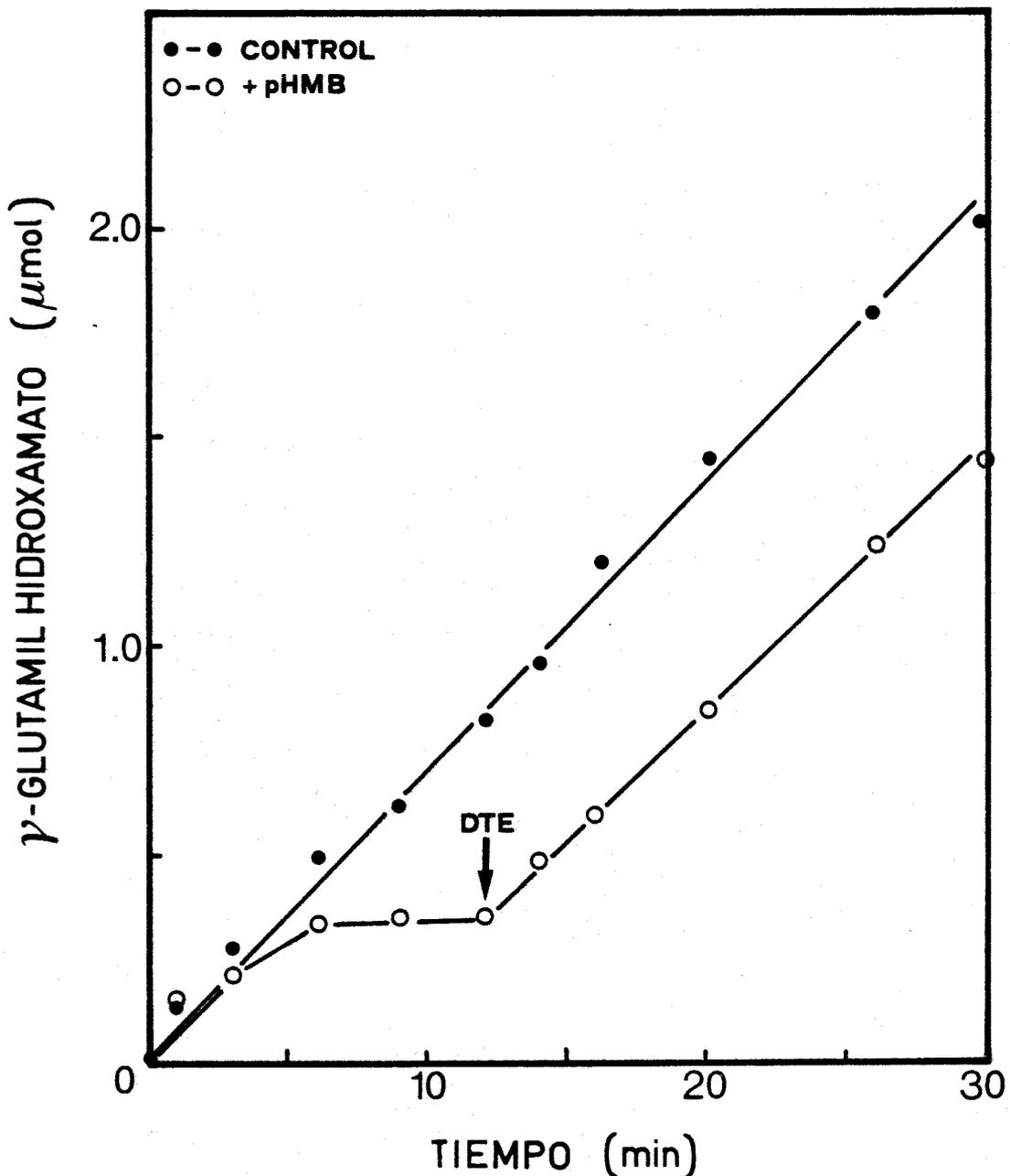


Figura 46.- Inhibición con pHMB y reactivación con DTE de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1.

Se incubaron a 30°C dos preparaciones con 30  $\mu\text{g}$  de GS purificada en 15 ml de la mezcla de ensayo transferasa. Una de ellas contenía pHMB 50  $\mu\text{M}$  desde el tiempo 0, y en el momento indicado por la flecha se le añadió DTE hasta una concentración 100  $\mu\text{M}$ . A distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de 1 ml a las que se les añadió el revelador de  $\text{FeCl}_3$  descrito en Materiales y Métodos.

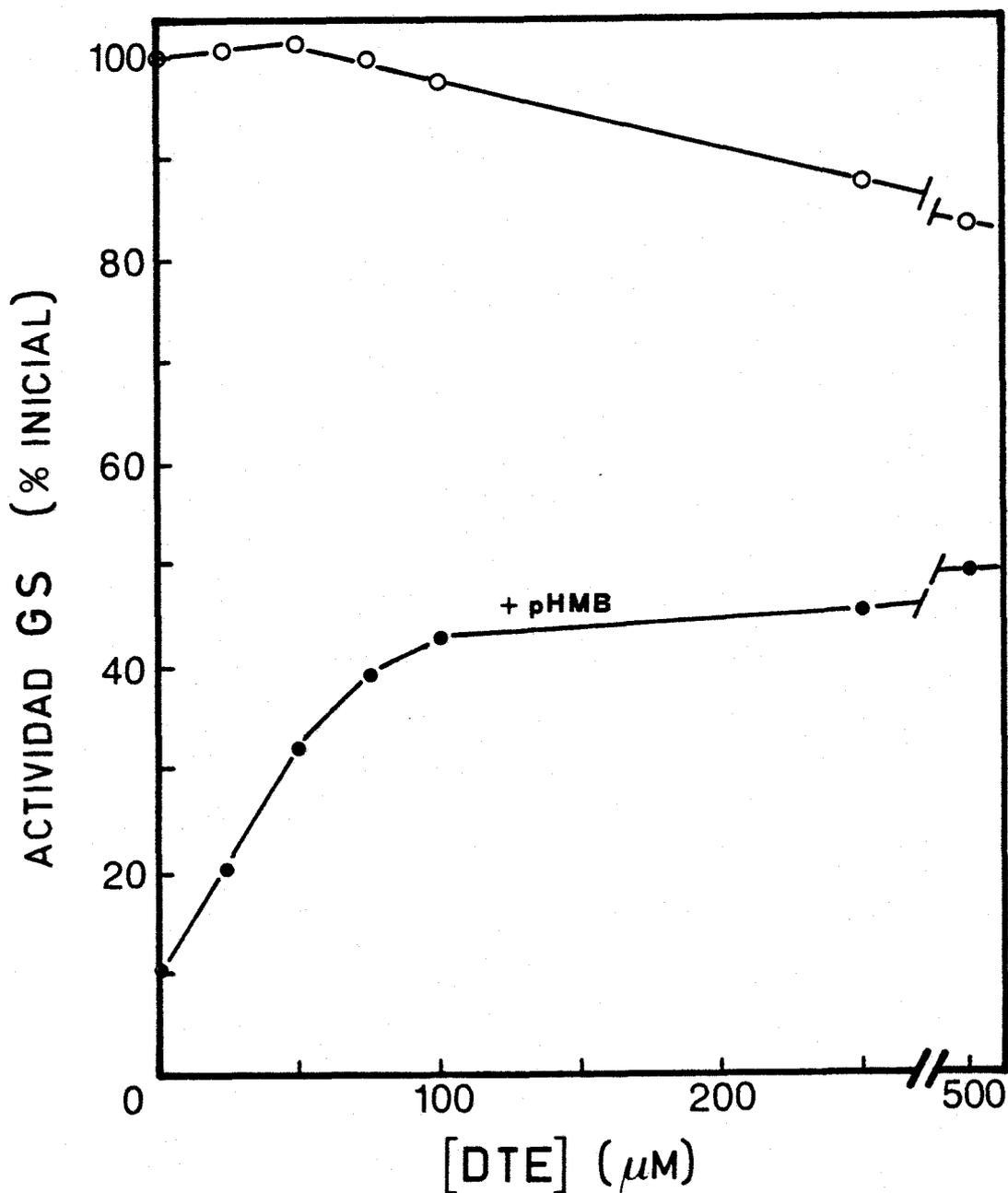


Figura 47.- Efecto del DTE sobre la actividad transferasa de la glutamina sintetasa de *R. capsulata* E1F1

Se añadió DTE a las concentraciones que se indican en la figura a distintas preparaciones de GS purificada (12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), preincubadas (●) y no preincubadas (O) con pHMB 0.5 mM, y se determinó su actividad transferasa total como se describe en Materiales y Métodos. El 100% de la actividad corresponde a 125 U/mg.

#### IV. DISCUSSION

Como se deduce de los resultados del presente trabajo y de otros encontrados recientemente (Cejudo 1982; Moreno-Vivián *et al.* 1983), la ruta principal de asimilación del nitrógeno nítrico en *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 comprende las reacciones catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS / GOGAT), previa reducción del nitrato a amonio mediante la nitrato y la nitrito reductasas.

Las células de *R. capsulata* E1F1 crecen fototróficamente con  $\text{KNO}_3$  o  $\text{KNO}_2$  como fuentes de nitrógeno. Este crecimiento se debe a una asimilación del nitrógeno nítrico y no a la fijación del  $\text{N}_2$  disuelto en el medio de cultivo, ya que la densidad celular alcanzada es mucho mayor en presencia de  $\text{KNO}_3$  que en presencia de  $\text{N}_2$  como única fuente de nitrógeno (Fig.2). Por otra parte, si se elimina el dinitrógeno disuelto (aproximadamente 16 mg/l a 30°C) mediante burbujeo con argon del medio de cultivo a lo largo del crecimiento, solamente se observa crecimiento en los medios que llevan  $\text{KNO}_3$  (Fig1).

Una prueba adicional de que esta bacteria es capaz de fotoasimilar el nitrato es que éste es consumido casi totalmente, sobre todo en los medios no burbujeados con argon (Fig.2). La posibilidad de que el nitrato sea utilizado por vía desasimiladora debe ser desechada ya que no se excreta nitrito al medio estequiométricamente con el

nitrate consumido y, además, no se han detectado gases procedentes de la desasimilación reductiva del nitrito ( $N_2$  o  $N_2O$ ).

Las actividades NR, NiR y GS son similares en presencia o ausencia de dinitrógeno. Sin embargo, la dinitrogenasa se inhibe en presencia de nitrito (Fig.4), como se ha observado en otras rodosporiláceas (Kelley *et al.* 1980; Castillo y Cárdenas 1982b) y bacterias no fotosintéticas fijadoras de dinitrógeno (Trinchant y Rigaud 1980; Castillo y Cárdenas 1982b).

El nitrito también puede ser fotoasimilado por esta bacteria, pero inhibe el crecimiento a concentraciones mayores de 3 mM. El efecto letal del nitrito puede ser debido a la formación de pequeñas cantidades de óxido nítrico, el cual, al formar complejos hierro-nitrosilo, destruye los centros sulfoferricos funcionales de las ferredoxinas (Reddy *et al.* 1983).

El pH del medio afecta al crecimiento de *R. capsulata* E1F1 (Fig.10 A). A pH 8.0 se observa una disminución en las actividades NR y GS respecto a las observadas en células cultivadas en medios neutros o débilmente ácidos. Por el contrario, los valores más altos de la NiR se encuentran a pH 8.0 y los más bajos a pH 6.0, lo que explica el que a este pH no crezcan las células cuando el nitrito es la única fuente de nitrógeno. Además el pH puede interferir con el crecimiento afectando a los sistemas de transporte del nitrato y del nitrito a través de la membrana.

La NR y la NiR de *R. capsulata* E1F1 son, al parecer, proteínas unidas a la membrana y fácilmente accesibles, ya que sus actividades pueden determinarse en células enteras (Moreno-Vivián 1981). De hecho, las NR y NiR desasimiladoras de *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* se encuentran en el espacio periplásmico de la bacteria (Sawada y Satoh 1980). Las NR y NiR de *R. capsulata* E1F1 son muy lábiles y sólo se pueden detectar en extractos acelulares obtenidos por tratamiento con glicerol (Tabla I). En *R. rubrum* también se ha podido determinar la actividad NR en células enteras (Kato 1963a), aunque en este caso la enzima se solubiliza fácilmente por sonicación, al igual que la NR de *R. capsulata* AD2 (Alef y Klemme 1977). La NR de *R. capsulata* BK5 se solubiliza por tratamiento con detergentes después de una extracción con acetona en frío (Klemme *et al.* 1981). Por el contrario, la NiR desasimiladora de *R. palustris* 1a1 y la de *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* se solubilizan fácilmente con ultrasonidos (Sawada *et al.* 1978; Preuss y Klemme 1983).

A diferencia de la NR y de la NiR, la GS de *R. capsulata* E1F1 se solubiliza fácilmente (Tabla I). También debe ser diferente su localización celular, ya que no se detecta actividad en células enteras, siendo preciso un tratamiento permeabilizador previo con tolueno o MTA.

Las enzimas estudiadas de la ruta de asimilación reductiva del nitrato son adaptativas, a excepción de la NR que sólo se detecta cuando en el medio de cultivo están

presentes el  $\text{NO}_3^-$  o el  $\text{NO}_2^-$ . La NiR y la GS se detectan siempre, independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada, encontrándose los valores más altos en células cultivadas en medios con nitrato o nitrito (Tabla II). El efecto de estos dos aniones, inductores de la NR y activadores de la NiR y de la GS, corrobora el carácter operativo de esta ruta para la asimilación de ambos, como se ha propuesto para bacterias fototróficas (Slater y Morris 1974; Johansson y Gest 1976; Brown y Herbert 1977a y b; Herbert *et al.* 1978; Madigan y Cox 1982).

La baja actividad NR observada en células cultivadas en medios con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se debe, probablemente, al efecto inhibitor del  $\text{NH}_4^+$  sobre la entrada del  $\text{NO}_3^-$  en las células (Jackson *et al.* 1981; Moreno-Vivián *et al.* 1982), como se ha descrito en cianobacterias, algas verdes y plantas superiores (Guerrero *et al.* 1981).

Al igual que en *R. rubrum* y *R. capsulata* B10 (Johansson y Gest 1977; Falk *et al.* 1982; Yoch *et al.* 1983), el amonio disminuye la actividad GS de las células de *R. capsulata* E1F1. Con L-glutamato se obtienen valores muy altos de la actividad GS, lo que puede deberse a la inducción de la enzima por su sustrato fisiológico, como se ha descrito en la estirpe B10 de *R. capsulata* (Johansson y Gest 1977) y en otros microorganismos no fotosintéticos (Mora *et al.* 1980).

Como se ha descrito en otras NR de bacterias fotosintéticas (Alef y Klemme 1977; Wesch y Klemme 1980; Satoh 1981; Kerber y Cárdenas 1982) y quimiotróficas (Guerrero *et al.* 1973; Villalobo *et al.* 1977), la NR particulada de *R. capsulata* E1F1 utiliza viológenos reducidos químicamente como donadores de electrones (Tabla V). También puede utilizar flavinas reducidas fotoquímicamente, de manera semejante a las NR de hongos, algas verdes y bacterias (Zumft *et al.* 1980). Si la reducción de las flavinas se lleva a cabo químicamente con ditionito no se produce la transferencia enzimática de los electrones al nitrato, probablemente porque lo impida algún subproducto formado en la oxidación del ditionito. Como en la mayoría de los organismos procariotas y al contrario que en hongos y plantas superiores, los piridín nucleótidos reducidos no son donadores de electrones en este proceso enzimático (Guerrero *et al.* 1981). Se han obtenido resultados semejantes en la reducción de nitrato por células enteras de esta misma bacteria (Moreno-Vivián 1981).

El requerimiento de metal(es) pesado(s) para la reacción catalizada por la NR se deduce del efecto inhibitorio de agentes quelantes de metales como el cianuro, la azida o la *o*-fenantrolina (Tabla VI). Una inhibición similar por  $\text{CN}^-$  o  $\text{N}_3^-$  se ha descrito en otras bacterias fotosintéticas (Wesch y Klemme 1980). Experimentos fisiológicos, realizados añadiendo cantidades crecientes de volframato a células que asimilan nitrato, indican que la NR de *R. cap-*

*sulata* E1F1 es una molibdoenzima. La presencia de molibdeno se ha propuesto para las NR de *R. sphaeroides* forma sp. *denitrificans* y DSM 158 (Sato 1981; Kerber y Cárdenas 1982) y se ha demostrado en la NR de *R. capsulata* AD2 (Alef y Klemme 1979), así como en las de otros muchos procariontes (Guerrero *et al.* 1981).

En la NR de *R. rubrum* se ha sugerido la presencia de hierro no hemínico (Kato 1963) y en la NR purificada de *R. capsulata* AD2 se han detectado grupos hemo (Alef y Klemme 1979). Sin embargo, la NR de la estirpe BK5 de *R. capsulata* no contiene ninguna forma de hierro (Wesch y Klemme 1980). Los experimentos fisiológicos, realizados añadiendo cantidades crecientes de hierro a distintos cultivos de *R. capsulata* E1F1, no parecen indicar que la NR de esta bacteria sea una hierroproteína.

La fuerte inhibición que ejercen los mercuriales, típicos reactivos de grupos sulfhidrilos en proteínas (Liu 1977), sobre la NR de *R. capsulata* E1F1 sugiere la presencia de grupos -SH esenciales para la catálisis enzimática. El DTE, agente reductor de enlaces disulfuro (Konigsberg y Steinman 1977), inhibe considerablemente la NR de esta bacteria, lo que indica que los puentes S-S son necesarios para mantener la conformación activa de la enzima. Se han descrito efectos inhibidores semejantes para las NR de diferentes organismos (Guerrero *et al.* 1981).

El clorato inhibe competitivamente la NR de distintos procariontes (Notton y Hewitt 1979), pero no las NR

de *R. capsulata* AD2 y BK5 (Wesch y Klemme 1980). La enzima de *R. capsulata* E1F1 tampoco se inhibe significativamente por dicho anión.

También la NiR utiliza como donadores de electrones los viológenos reducidos químicamente, principalmente MVH. La eficiencia de las flavinas reducidas, química o fotoquímicamente, como donadores de electrones para la NiR no es muy alta. Los piridín nucleótidos son totalmente ineficaces como donadores. Por el contrario, el citocromo *c* y la ferredoxina de procariotas son buenos donadores de electrones (Tabla XI). Estos resultados coinciden con los obtenidos para las NiR de otros organismos fotosintéticos, que son dependientes de ferredoxina, frente a las NiR de los organismos no fotosintéticos, que son dependientes de piridín nucleótidos (Guerrero *et al.* 1981). El citocromo *c*<sub>2</sub> se ha propuesto como donador fisiológico de electrones para la NiR desasimiladora de *R. sphaeroides* forma sp. denitrificans (Sawada y Satoh 1980).

La NiR asimiladora de organismos fotosintéticos es una hierroproteína, con el hierro formando parte de un sirohemo o de centros sulfoféricos (4Fe - 4 S) (Vega *et al.* 1980). Los resultados obtenidos con la enzima de *R. capsulata* E1F1 sugieren la presencia de hierro, ya que la actividad aumenta con la adición al medio de cantidades crecientes de hierro (Fig.18) y, además, es muy sensible a diferentes agentes quelantes de metales (Tabla X).

El pHMB inhibe la NiR de eucariotas (Vega *et al.* 1980), pero no la de cianobacterias (Manzano 1977; Méndez *et al.* 1981), análogamente a lo que ocurre con la NiR de *R. capsulata* E1F1, que tampoco se inactiva con la azida ni con el cianato (Tabla X).

La estabilidad térmica de la NR y de la NiR de *R. capsulata* E1F1 es bastante diferente. Así, la NiR mantiene prácticamente su actividad a 40°C durante 10 minutos (Kerber *et al.* 1981), mientras que la NR pierde su actividad a temperatura ambiente con bastante facilidad.

El pH óptimo descrito para la actividad de diferentes NR y NiR está en torno a 7.5 (Guerrero *et al.* 1981). El pH óptimo para la NR de *R. capsulata* E1F1 es 8.0, y para la NiR es 7.0. Las zonas de pH en las que son más estables ambas enzimas son también algo diferentes, y así mientras la NR es relativamente estable en el rango de pH entre 7.5 y 9.0, la NiR lo es entre 6.0 y 7.0, resultados que están en contradicción con los obtenidos en los experimentos fisiológicos de crecimiento a distintos pH (Fig. 11). Estas diferencias pueden explicarse por una variación en la conformación de las proteínas debido al procedimiento de permeabilización empleado, o por un efecto *in vivo* del pH del medio sobre los sistemas de transporte del nitrato y del nitrito, que afecta a las actividades NR y NiR intracelulares.

Los estudios realizados sobre las etapas enzimáticas de reducción del nitrógeno nítrico a amoniaco, que acabamos de discutir, se han completado con otros sobre la regulación de la síntesis y de la actividad GS, así como sobre sus propiedades moleculares. La importancia de estos estudios, en los que se han empleado algunas técnicas inmunológicas, radica en el papel clave que desempeña esta enzima en el metabolismo de las bacterias, ya que en la reacción que cataliza confluyen los productos de los ciclos metabólicos del carbono y del nitrógeno (Stadtman y Ginsburg 1974; Magasanik y Rothstein 1980).

La mayoría de las glutaminas sintetasas de bacterias Gram-negativas están reguladas por diversos mecanismos:

- (1) por represión - desrepresión de la síntesis de la enzima;
- (2) por alteraciones covalentes reversibles ( adenilación - desadenilación ) de un residuo específico de tirosina de cada subunidad;
- (3) por retroinhibición acumulativa por productos del metabolismo de la glutamina; y
- (4) por interconversión de la forma relajada ( inactiva ) en la forma tensa ( activa ) como respuesta a la concentración de cationes divalentes (Shapiro y Stadtman 1970; Tyler 1978; Magasanik y Rothstein 1980).

Los diversos tipos de regulación se han estudiado en bacterias fotosintéticas de la familia de las rodospir

láceas (Johansson y Gest 1977; Alef y Zumft 1981; Engelhardt y Klemme 1981; Sakhno *et al.* 1981; Davies y Ormerod 1982; Moreno-Vivián *et al.* 1983; Yoch *et al.* 1983). En otros organismos fotosintéticos como cianobacterias, algas verdes y plantas superiores, la GS no se regula por adenilación - desadenilación, sino por retroinhibición por metabolitos de la glutamina, principalmente aminoácidos y nucleótidos (Stewart y Rhodes 1977).

La síntesis de la GS de *R. capsulata* se reprime fundamentalmente por amonio y, en menor grado, por L-alanina y L-glutamina (Tabla II y Figs.9 y 37). Este efecto también se ha descrito en otras bacterias de la misma familia (Johansson y Gest 1977; Brown y Herbert 1977b; Engelhardt y Klemme 1981; Sakhno *et al.* 1981) y tiene lugar a nivel de expresión genética. Mediante estudios con mutantes, Magasanik y Rothstein (1980) han descrito un complejo sistema de regulación en enterobacterias mediante el cual el efecto del amonio se explica en función de la presencia de la proteína  $P_{II}$  (represión de la GS) o de  $P_{II}$ -UMP (final de la represión). En células carentes de amonio, la razón (glutamina) / (2-oxoglutarato) es baja, por lo que se activa la enzima UTasa, y  $P_{II}$  se transforma en  $P_{II}$ -UMP, con lo que la GS se desreprime. Lo contrario sucede en presencia de amonio (vease el Esquema 4 de la Introducción). Este mismo sistema de regulación puede ser operativo para la GS de *R. capsulata* E1F1.

La regulación de la actividad GS por el mecanismo de adenilación - desadenilación, descrito para *Escherichia coli* (Shapiro *et al.* 1967) y comprobado en diversas bacterias fotosintéticas (Johansson y Gest 1977; Alef y Zumft 1981; Engelhardt y Klemme 1981; Davies y Ormerod 1982; Khanna y Nicholas 1983a y b), también tiene lugar en *R. capsulata* E1F1 (Figs.7 - 9 y 36). En algunas bacterias fotosintéticas verdes, por el contrario, no se ha podido demostrar la existencia de este tipo de interconversión metabólica reversible de la GS (Davies y Ormerod 1982; Kaulen y Klemme 1983).

El grado de adenilación de la GS de *R. capsulata* E1F1 es función de la fuente de nitrógeno del medio, de la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo y de la intensidad luminosa que éste recibe. Durante la fase de latencia la GS se encuentra adenilada en más del 50% ( $\bar{n} = 6$ ), debido probablemente a que en dicha fase el requerimiento de nuevos compuestos nitrogenados no debe ser muy elevado. Sin embargo, en el caso en que la fuente de nitrógeno es el  $N_2$  disuelto, el grado de adenilación es inferior a 2 durante la fase de latencia, llegando a estar casi completamente desadenilada en la fase de crecimiento exponencial. Este proceso de desadenilación durante el crecimiento se requiere porque la GS desadenilada promueve la activación de la dinitrogenasa, enzima responsable del crecimiento en medios con  $N_2$  como fuente de nitrógeno (Tyler 1978; Magasanik y Rothstein 1980; Falk *et al.* 1982).

En los medios que contienen formas oxidadas de ni-

trógeno, el grado de adenilación disminuye al comenzar la fase de crecimiento exponencial, a la vez que aumenta la actividad específica de la enzima. Estos resultados están de acuerdo con la idea de que, para la activación de la síntesis de enzimas del metabolismo del nitrógeno, es necesario que aumenten los niveles celulares de GS y que ésta se encuentre desadenilada (Magasanik y Rothstein 1980). La disminución en el grado de adenilación de la GS se produce también cuando la fuente de nitrógeno es extracto de levadura, L-glutamato y L-alanina, aunque en los medios con estos aminoácidos se mantiene el grado de adenilación al principio de la fase exponencial, para disminuir cuando el cultivo ha alcanzado ya un cierto nivel de crecimiento. Esta variación puede explicarse suponiendo que al principio las concentraciones de estos aminoácidos son suficientes para mantener el crecimiento celular y que solamente cuando se han consumido en parte, la GS se desadenila y se pone en marcha el mecanismo activador de las enzimas encargadas de la asimilación del nitrógeno inorgánico. Cuando la fuente de nitrógeno es la L-glutamina el grado de adenilación se mantiene siempre alto ( $\bar{n} = 8$ ), como era de esperar por los altos valores de la relación (glutamina) / (2-oxoglutarato). En presencia de amonio el grado de adenilación aumenta durante la fase de crecimiento exponencial, a la vez que la actividad específica permanece constante (Fig.9), lo que puede explicarse en términos del efecto del amonio sobre el sistema de regulación bicíclico propuesto por Magasanik y Rothstein (1980) y que se ha discutido anteriormente.

Estos resultados se han corroborado mediante estudios de inmunoprecipitación cuantitativa. En esta técnica inmunológica la altura de las bandas de precipitación es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en las muestras e inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo en el soporte utilizado para la electroforesis (Weeke 1973a). Los anticuerpos son capaces de reaccionar con las formas no degradadas del antígeno, siempre que éste conserve los determinantes antigénicos. En el caso de la GS de *R. capsulata* E1F1 los anticuerpos anti-GS detectan tanto la forma adenilada como la desadenilada (Romero 1983).

En el presente estudio se ha podido observar cómo la adición de amonio o L-alanina afecta tanto al nivel enzimático como al estado de adenilación de la GS en células que están creciendo en medios con nitrato como fuente de nitrógeno (Fig.38). El amonio, y en forma similar aunque menos pronunciada la L-alanina, provoca la rápida adenilación de la enzima y la disminución de su actividad específica. Los resultados inmunolectroforéticos muestran también una disminución de la cantidad de enzima presente en estas células. El efecto ejercido por el amonio ya se ha explicado anteriormente por la producción de una mayor proporción de la proteína  $P_{II}$  respecto a  $P_{II}$ -UMP.

En *Klebsiella aerogenes* se ha descrito un mecanismo proteolítico de degradación de la GS en dos pasos, el primero de los cuales consiste en la oxidación específica

de un residuo de histidina de cada subunidad, siendo esta oxidación tanto más fácil cuanto mayor es el grado de adenilación de la enzima (Levine *et al.* 1981). Este mecanismo también puede explicar los resultados encontrados para la GS de *R. capsulata* E1F1, ya que la concentración intracelular de GS es mínima en las células cultivadas en medios en que la enzima tiene un grado de adenilación máximo.

Al añadir MSX 50  $\mu$ M a cultivos de *R. capsulata* E1F1 creciendo en la luz con  $\text{KNO}_3$ , se detiene el crecimiento instantáneamente. Este efecto se revierte totalmente a las 5 - 10 horas (Fig.39). Durante este período se inactiva la GS y aumenta la concentración de amonio en el medio, el cual es reasimilado al reanudarse el crecimiento, aunque sólo se recupera un 5% de la actividad GS. Moreno-Vivián *et al.* (1983) han demostrado que en presencia de MSX las células de *R. capsulata* E1F1 inducen las actividades alanina deshidrogenasa y alanina : 2-oxoglutarato aminotransferasa, lo que puede explicar el crecimiento mediante la ruta alternativa ADH / AOAT cuando se añade el MSX.

El estudio inmunológico de la cantidad de GS en células tratadas con MSX revela que existen diferencias respecto a lo descrito anteriormente para células cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno (Fig.40). El desarrollo de la inmunoelectroforesis cuantitativa indica que en las células tratadas con MSX existe un tipo de GS inactiva que no se detecta por el ensayo de la actividad

transferasa. En la cianobacteria *Anabaena* sp. 7120, cuya GS no está modulada por adenilación - desadenilación, se ha descrito un comportamiento inmunológico parecido en respuesta a la adición de MSX (Orr y Haselkorn 1982). La superproducción de GS puede ser una forma de eliminar el MSX del medio, ya que éste se une específica e irreversiblemente a la enzima (Meister 1980).

En esta misma estirpe de *R. capsulata* se ha descrito también que en presencia de MSX primero se bloquea parcialmente la entrada de nitrato y luego, cuando se reanuda el crecimiento, se desregula el sistema de transporte y el amonio y el nitrato entran simultáneamente en las células (Caballero *et al.* 1982; Moreno-Vivián *et al.* 1983).

En *R. capsulata* E1F1 la luz afecta al proceso de asimilación del nitrógeno inorgánico en distintos puntos de esta ruta metabólica. La oscuridad, además de impedir la fijación de  $N_2$ , impide el consumo de nitrato (Moreno-Vivián *et al.* 1982), L-glutamato y L-alanina (Fig.41 A) y dispara el proceso de adenilación de la GS, si bien no altera esencialmente las actividades enzimáticas totales de la NR, la NiR y la GS.

El efecto de la intensidad de la luz sobre el estado de adenilación de la GS se ha estudiado en *R. capsulata* B10 (Johansson y Gest 1977), encontrándose que, salvo cuando la concentración de amonio en el medio es alta, al aumentar la intensidad luminosa disminuye el grado de adenilación. Este efecto se ha atribuido al aumento de la

concentración intracelular de ATP u otros nucleótidos trifosfatos que interaccionan con el sistema de control bicíclico de la adenilación. Un efecto similar de la intensidad luminosa sobre el grado de adenilación se ha descrito en *R. sphaeroides* DSM 158 (Engelhardt y Klemme 1981) y se ha encontrado en *R. capsulata* E1F1. La disminución de la intensidad luminosa relativa que reciben las células en la fase estacionaria, debido al aumento exponencial de su número, puede ser una de las causas del aumento del grado de adenilación de la GS de *R. capsulata* E1F1 que se observa en dicha fase.

Los resultados discutidos anteriormente acerca de la inhibición del consumo de nitrógeno nítrico y de L-aminoácidos en la oscuridad, así como la adenilación y subsecuente inactivación de la GS provocada por la oscuridad, demuestran que existe una estrecha relación entre el funcionamiento del aparato fotosintético y el metabolismo del nitrógeno en *R. capsulata* E1F1.

En los últimos años se han descrito diversos métodos de purificación de la GS de bacterias fotosintéticas, tanto rodospiriláceas como clorobiáceas. Lepo *et al.* (1979) han purificado por cromatografía de afinidad en Azul de sefarosa la GS de *R. sphaeroides* 2.4.1. Ga, obteniendo un grado de purificación de 66, una actividad específica de 103 U/mg y un rendimiento del 45%. Empleando la cromatografía de afinidad en Azul de sefarosa C1-6B (Pharmacia), se ha purificado 32 veces (107 U/mg de acti

vidad específica y 27% de rendimiento) la GS de *R. palustris* (Alef *et al.* 1981). Soliman *et al.* (1981) han logrado una purificación similar de la GS de *R. rubrum*, empleando la afinidad en ADP-agarosa. La GS de *R. sphaeroides* DSM 158 se ha purificado, siguiendo un método semejante, unas 200 veces con un rendimiento del 46% y una actividad específica de 120 U/mg (Engelhardt y Klemme 1982). La GS de *R. rubrum* S-1 se ha purificado 33 veces, aunque con una actividad específica y un rendimiento muy bajos (65 U/mg y 3%, respectivamente), mediante un tratamiento de cinco pasos con la inclusión de varios procesos cromatográficos (Yoch *et al.* 1983). También se ha purificado la GS de *Chlorobium vibriforme* f. *thiosulfatophilum* (Khanna y Nicholas 1983a), mediante tres pasos sucesivos de cromatografía en DEAE-celulosa y en sefarosa 6B, obteniéndose una actividad específica de 50 U/mg y un rendimiento del 35%.

La mayoría de los métodos de purificación mencionados constan de varias etapas, con las consiguientes pérdidas a lo largo del proceso. El método utilizado en la purificación de la GS de *R. capsulata* E1F1 es similar al descrito para la enzima de *R. rubrum* por Soliman *et al.* (1981), aunque se diferencia de éste en la forma de obtener el extracto utilizado para la columna de afinidad, en el tipo de matriz de la columna y en el mayor rendimiento del proceso. En la columna de 2',5'-ADP sefarosa se introduce el sobrenadante que resulta al precipitar con MTA el extracto obtenido mediante ultrasonidos (Tabla XII). La

afinidad de la enzima por esta matriz es bastante grande, como se puede deducir del hecho de que al lavarla con ADP 10 mM sólo se obtiene el 8% de la actividad, y de que es necesario añadir fuerza iónica al tampón (KCl 0.3 M, ADP 3 mM) para recuperar la mayor parte de la enzima (Fig.19). Los distintos métodos de purificación enumerados emplean únicamente ADP para despegar la GS de la matriz. La GS de *R. capsulata* E1F1 se ha obtenido con un grado de purificación de 123, con una actividad transferasa específica de 185 U/mg y una recuperación del 81% (Tabla XII).

La preparación enzimática obtenida por este procedimiento es homogénea según criterios electroforéticos e inmunológicos. En la electroforesis analítica discontinua en gel de poliacrilamida de preparaciones recién obtenidas aparece una única banda de proteína con actividad GS (Figs. 20 y 21). Mediante la técnica de doble inmunodifusión se confirma este resultado, ya que sólo se obtiene una banda de precipitación, con la que coincide la de la actividad GS (Fig.23). El análisis electroforético de muestras de enzima, varias horas después de su purificación (Fig.22), indica la existencia de diversas bandas debidas a la disociación parcial de la enzima nativa en distintos oligómeros, como se discutirá más adelante. Una disociación parecida se ha encontrado en la GS de *R. palustris* (Alef *et al.* 1981) y en la de *Azotobacter vinelandii* (Kleinschmidt y Kleiner 1978).

Recientemente se han separado dos isoenzimas de la GS en diversas bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Darrow y Knotts 1977; Fuchs y Keister 1980a y b). Soliman *et al.* (1982) han propuesto la separación de dos isoenzimas de la GS en la bacteria fotosintética *R. rubrum* mediante filtración en gel y electroenfoque. En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se han separado dos GS mediante cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP sefarosa 4B (Florencio y Vega 1983). En *R. capsulata* E1F1 no se ha podido detectar la existencia de tales isoenzimas por las diferentes técnicas ensayadas, aunque los resultados de la inmunoelectroforesis cruzada apuntan hacia la existencia, en esta bacteria, de dos formas de GS inmunológicamente diferentes (Fig.24).

La GS de *R. capsulata* E1F1 tiene diferentes pH óptimos para la forma adenilada (6.5) y para la desadenilada (7.5) (Fig.25). Cuando el grado de adenilación es 6 el pH óptimo es la media de los dos valores (7.0). La existencia de un pH óptimo para cada forma es un hecho bastante general en las GS de bacterias. Así, en *R. palustris* los pH óptimos son 7.3 y 7.8 para las formas adenilada y desadenilada, respectivamente (Alef y Zumft 1981), en *E. coli*, 6.9 y 8.0 (Shapiro y Stadtman 1970) y en *A. vinelandii*, 6.0 y 7.0 (Kleinschmidt y Kleiner 1978).

La enzima conserva prácticamente toda su actividad si se mantiene durante 2 horas a temperatura ambiente a diferentes pH entre 5.5 y 9.0 (Fig.28). La amplitud de esta

zona permite que la GS pueda existir a los pH óptimos de las dos formas sin degradación apreciable.

La GS de *R. capsulata* E1F1 presenta una temperatura óptima de 43°C para la actividad transferasa (Fig.26) y una moderada estabilidad con la temperatura, manteniéndose más del 80% de actividad al cabo de 90 minutos a 35°C y el 90% a 20°C durante 2 horas, mientras que pierde la mitad de la actividad en 1 hora a 60°C (Fig.29). Esta resistencia a la temperatura no es un fenómeno aislado en las GS bacterianas (Darrow y Knotts 1977; Fuchs y Keister 1980b).

El valor de energía de activación para la actividad transferasa ( 21.6 kJ·mol<sup>-1</sup> ; Fig.27) es inferior a los descritos para las GSI y GSII de *C. reinhardtii* (Florencio y Vega 1983).

En la Tabla XVI se comparan los valores de algunos parámetros cinéticos y moleculares para las GS de diferentes bacterias. Hasta el momento, las GS bacterianas descritas son oligómeros de peso molecular cercano a 600 kDa, compuestos de 12 subunidades idénticas, según se desprende del análisis secuencial de aminoácidos (Orr *et al.* 1981). Sin embargo, existen excepciones como la GSII de *Rhizobium japonicum*, que no se modula por adenilación - desadenilación, tiene un peso molecular de 205 kDa y está compuesta por 6 subunidades más pequeñas ( 36 kDa ) que las de la GSI ( 59 kDa ) (Darrow 1980; Darrow *et al.* 1982). La enzima de *R. capsulata* E1F1 estudiada en el presente trabajo respon-

TABLA XVI

	<i>R. capsulata</i>	<i>R. palustris</i>	<i>R. rubrum</i>	<i>R. sphaeroides</i>	<i>C. vibriforme</i>
Peso molecular (kDa)	665 ± 5	670	630	600	-
Número de subunidades	12	12	12	12	-
S <sub>20,w</sub> (S)	19.2	-	-	-	-
Radio de Stokes (nm)	8.35	-	-	-	-
Diámetro (nm)	-	15.3 ± 0.13	-	14 ± 0.8	-
Altura (nm)	-	11.1 ± 0.47	-	9 ± 0.6	-
f / f <sub>0</sub>	1.45	1.38	-	1.55	-
Activ. específica (U/mg) transferasa	185	143	125	120	50
biosintética	6.7	2.0	-	-	-
Número de cambio act. transferasa	2035*	1600*	1300*	1200*	-
act. biosintética	70 (74*)	22*	-	-	-
pH óptimo adenilada	6.5	7.3	-	-	-
desadenilada	7.5	7.8	-	-	-
Km (mM): glutamato	6.5	9.0	-	-	2.2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.3	0.4	-	-	0.2
ATP	0.5	1.0	-	-	-
glutamina	12	-	-	-	15.7
NH <sub>2</sub> OH	6	-	-	-	4.5
ADP	0.01	-	-	-	-
- SH por subunidad	9	9	-	-	-
Referencias	1	2 y 3	4 y 5	6	7

TABLA XVI (CONTINUACION)

	<i>E. coli</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>Anabaena 7120</i>	<i>A. cylindrica</i>	<i>A. nidulans</i>
Peso molecular (kDa)	600	640	610	591	590
Número de subunidades	12	12	12	12	12
S <sub>20,w</sub> (S)	20.3	20.2	-	-	18.9
Radio de Stokes (nm)	-	-	-	-	7.72
Diámetro (nm)	13.7	-	-	-	-
Altura (nm)	8.5	-	-	-	-
f / f <sub>0</sub>	1.61	-	-	-	-
Activ. específica (U/mg) transferasa biosintética	90	104	213	32	205
Número de cambio act. transferasa	-	5	16.4	10	11
Número de cambio act. biosintética	900	1110*	2180	315*	2016*
pH óptimo adenilada	-	54*	167	94*	108*
desadenilada	6.9	6.0	7.0	7.0	7.0
Km (mM): glutamato	8.0	7.0	-	-	-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2.4	1.2	2.1	2	5
ATP	1.8	0.15	<0.02	1	0.02
glutamina	0.68	0.94	0.32	-	0.7
NH <sub>2</sub> OH	3.6	-	-	5	-
A DP	4.6	-	-	6	-
-SH por subunidad	0.04	-	-	-	-
Referencias	5	4	7	-	5
	8, 9 y 10	11 y 12	13 y 14	15 y 16	17

## Referencias de la Tabla XVI

- 1 Este trabajo
- 2 Alef *et al.* 1981
- 3 Alef y Zumft 1981
- 4 Soliman *et al.* 1981
- 5 Yoch *et al.* 1983
- 6 Engelhardt y Klemme 1982
- 7 Khanna y Nicholas 1983a
- 8 Woolfolk *et al.* 1966
- 9 Valentine *et al.* 1968
- 10 Stadtman y Ginsburg 1974
- 11 Kleinschmidt y Kleiner 1978
- 12 Siedel y Shelton 1979
- 13 Orr *et al.* 1981
- 14 Orr y Haselkorn 1981
- 15 Sampaio *et al.* 1979
- 16 Sawhney y Nicholas 1978
- 17 Florencio y Ramos 1983

(\*) valores de número de cambio calculados como:

$$\text{N.C.} = \text{Activ. especif. (U/mg)} \times \frac{\text{Peso molec (kDa)}}{1 \mu\text{mol enzima}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}$$

de al tipo general de las GS bacterianas, con un peso molecular para la enzima nativa de 660 kDa, obtenido por filtración en gel (Fig.32), de 661 kDa por filtración en gel y centrifugación en gradiente de viscosidad (Figs.30 y 31), o de 670 kDa por electroforesis con geles de acrilamida de distinto tamaño de poro (Fig.33). Está compuesta por 12 subunidades fácilmente dissociables como indican los datos de filtración en gel y de electroforesis, así como la forma ancha del precipitado inmunolectroforético (Fig.24). Esta facilidad de desagregación explica el hecho de que no se obtenga un solo pico en la cromatografía de filtración en gel y la aparición de nuevas bandas al desarrollar la electroforesis de muestras de GS varias horas después de su purificación (Figs.20 y 22). La representación de los valores de  $K_{av}$  obtenidos por cromatografía, o de los  $R_f$  de las bandas electroforéticas, en función del logaritmo del peso molecular, permite concluir que corresponden a distintas agrupaciones oligoméricas de la proteína, desde 12 ( enzima nativa ) hasta 1 ( monómero ) (Figs.32 y 34). En *A. vinelandii* y en *R. palustris* también se han descrito formas oligoméricas con distinta movilidad electroforética (Kleinschmidt y Kleiner 1978; Alef *et al.* 1981).

El coeficiente de sedimentación de la GS de *R. capsulata* E1F1, 19.2 S (Fig.31), es semejante a los encontrados para otras bacterias (Tabla XVI) y mayor que el de las GS de *C. reinhardii* ( 14.6; Florencio y Vega 1983) y cebada ( 14.1; Mann *et al.* 1979) o el de la GSII de *R. japonicum*

(9.5; Darrow *et al.* 1982). El valor obtenido para el radio de Stokes de la GS de *R. capsulata* E1F1 es algo mayor que el calculado para la enzima de *A. nidulans* (Tabla XVI) y bastante diferente de los descritos para eucariotas, que son del orden de 6.3 nm (Mann *et al.* 1979; Florencio y Vega 1983). Estas semejanzas y diferencias no son sorprendentes, ya que la GS bacteriana es un dodecámero con un peso molecular de unos 600 kDa, mientras que la de eucariotas es una proteína octamérica con un peso molecular cercano a 350 kDa.

El valor de 1.45 para la fricción relativa indica que la GS de *R. capsulata* E1F1 no es esférica, sino elipsoidal (Tabla XV). Los estudios de microscopía electrónica de las GS de bacterias confirman dicha forma de la enzima, consistente en dos agrupaciones hexagonales superpuestas con seis subunidades cada una, con un diámetro de unos 14 nm y una altura total de 8 - 11 nm, lo que implica una fricción relativa del orden de 1.5 (Tabla XVI). En algunos microorganismos, como *Bacillus caldolyticus* y *Anabaena* 7120, se ha observado un cierto desplazamiento relativo de los anillos hexagonales (Wedler *et al.* 1980; Orr *et al.* 1981), pero en la mayoría de las GS estudiadas la superposición es total (Valentine *et al.* 1968; Alef *et al.* 1981; Engelhardt y Klemme 1982).

Los valores de Km de la GS para el  $\text{NH}_4^+$  y el ATP son muy bajos, y semejantes a los descritos en otras bacterias (Tabla XVI). Estos resultados están de acuerdo con el

efecto regulador del amonio y el ATP ( y no del glutamato ) sobre la actividad GS *in vivo*. La Km para el ADP también es bastante baja, tal como se ha descrito para las GS de *E. coli* (Woolfolk *et al.* 1966) y de arroz (Iyer *et al.* 1981). En *R. palustris* se ha observado una alta especificidad de la GS para el ADP (Alef *et al.* 1981).

El número de cambio encontrado para la actividad biosintética de la GS de *R. capsulata* E1F1 ( 70 mol sustrato / mol enzima · s ; Tabla XIII) es intermedio entre los obtenidos en otras GS bacterianas, mientras que el de la actividad transferasa está entre los más elevados de los descritos en este tipo de microorganismos (Tabla XVI). Los valores del número de cambio para ambas actividades de la GS de bacterias fotosintéticas, calculados a partir de las actividades específicas de las enzimas purificadas, son menores que los de *R. capsulata* E1F1.

La actividad GS disminuye en presencia de diferentes productos del metabolismo de la glutamina. Esta retroinhibición se ha estudiado ampliamente en bacterias, encontrándose que los L-aminoácidos alanina, glicina y serina suelen ser unos potentes inhibidores de la actividad GS, variando su efecto de unos organismos a otros (Woolfolk y Stadtman 1967; Orr y Haselkorn 1981). Estos tres aminoácidos interaccionan con la GS de *E. coli* en el mismo sitio, lo que provoca un efecto acumulativo de la retroinhibición (Stadtman y Ginsburg 1974). En algunas GS también se ha observado retroinhibición por otros L-aminoácidos como gluta

mina, aspartato, triptófano o cisteína (Orr y Haselkorn 1981). En organismos cuya GS no está regulada por adenilación - desadenilación se han determinado las concentraciones intracelulares de estos aminoácidos (aproximadamente 1 mM para alanina y glicina en *Anabaena cylindrica*). Estos valores son suficientemente altos como para producir una inhibición significativa, por lo que en dichos organismos la GS puede estar regulada de un modo efectivo por este mecanismo (Orr y Haselkorn 1981).

En la bacteria fotosintética *R. palustris* también se da este tipo de retroinhibición, variando el efecto de los distintos aminoácidos con el grado de adenilación de la GS y siendo más acentuados los efectos sobre la actividad transferasa que sobre la biosintética. La alanina, la glicina y la serina son los inhibidores más fuertes de la enzima desadenilada (Alef y Zumft 1981). En *R. capsulata* E1F1, además de estos tres aminoácidos, el aspartato y la valina inhiben no competitivamente respecto al glutamato (Tabla XV y Fig.42). Los datos existentes sobre este punto en otros organismos son escasos e incluso contradictorios. En *E. coli* la inhibición producida por la glicina y la alanina es competitiva respecto al glutamato (Stadtman y Ginsburg 1974), mientras que en *A. nidulans* la inhibición por alanina y aspartato es no competitiva (Florenccio y Ramos 1983). También es de tipo no competitivo, respecto al glutamato, la inhibición por el aspartato y la serina en *Anabaena* sp. C.A. y 7120 (Stacey *et al.* 1979; Orr y Haselkorn 1981). En *A. cylindrica* la inhibición por alanina

y serina es de tipo incompetitivo (Sawhney y Nicholas 1978) y en *Anabaena flosaquae* la inhibición por alanina es de tipo mixto (McMaster *et al.* 1980).

Ginsburg y Stadtman (1973 y 1974) han estudiado el efecto de determinados cationes divalentes, como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , sobre la GS de *E. coli*, encontrando un requerimiento esencial de los mismos para la estabilidad de la enzima que, en presencia de agentes quelantes de metales como el EDTA, se hace sensible al ataque por reactivos de grupos sulfhidrilos y por agentes desnaturalizantes como SDS o urea. El aumento de la concentración de estos cationes en el medio va acompañado de un incremento en la actividad de la GS, lo que se explica en términos de conversión de la forma relajada de la enzima (inactiva) en la forma catalíticamente activa. En este cambio conformacional, catalizado por  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , participan un residuo de triptófano, otro de tirosina y un grupo -SH por subunidad, y va acompañado de la pérdida de reactividad de los grupos -SH. También se ha encontrado que al aumentar el grado de adenilación de la enzima aumenta la actividad biosintética dependiente de  $Mn^{2+}$  y disminuye la que es dependiente de  $Mg^{2+}$ . En general, la actividad GS de bacterias depende principalmente de  $Mg^{2+}$  y está regulada por la concentración de otros cationes como  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Tyler 1978; Ip *et al.* 1983). En *R. capsulata* B10 la actividad biosintética de la GS de células cultivadas con amonio requiere  $Mn^{2+}$ , mientras que la de las células cultivadas con

dinitrógeno como única fuente de nitrógeno es dependiente de  $Mg^{2+}$  (Johansson y Gest 1977).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con preparaciones semiadeniladas de GS de *R. capsulata* E1F1 ( $\bar{n} = 7.0$ ), indican que la actividad biosintética de la forma adenilada depende de iones  $Mn^{2+}$ , encontrándose se que el valor máximo se obtiene cuando la relación de  $Mn^{2+}$  a ATP es aproximadamente 1 (Fig.43), lo que hace pensar que el sustrato activo para la enzima adenilada debe ser el complejo  $MnATP^{2-}$ . Resultados similares han obtenido Alef y Zumft (1981) con la GS de *R. palustris*.

Por último se ha examinado el papel que juegan los grupos -SH en la actividad enzimática de la GS de *R. capsulata* E1F1. La titulación de los grupos sulfhidrilos de la enzima, realizada en un tampón con SDS para hacerlos accesibles al pHMB, indica la existencia en esta proteína de 9 grupos -SH por cada subunidad (Fig.35), lo que coincide con el número de cisteínas encontradas en cada subunidad de la GS de *R. palustris* (Alef et al. 1981). Este número, sin embargo, es bastante mayor que el encontrado en otras bacterias (Tabla XVI), aunque es inferior al número de cisteínas por subunidad de algunas GS de mamíferos (Tate y Meister 1973).

El pHMB es un inhibidor no competitivo de la actividad transferasa de la GS de *R. capsulata* E1F1 ( $K_i = 235 \mu M$ ; Fig.45), lo que sugiere la participación de grupos sulfhidrilos en el proceso catalítico. La actividad transferasa

de la GS de *Anabaena* L-31 se afecta también fuertemente por el pHMB, con independencia de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo del que provengan las células (Tuli y Thomas 1981). En el alga verde *C. reinhardtii* las dos GS se inactivan completamente por este compuesto (Florencio y Vega 1983). En plantas superiores se ha encontrado que la actividad de la GS está modulada por el cambio de la orientación y del estado de oxidación de determinados residuos de cisteína (Rhodes *et al.* 1979).

En cianobacterias (Florencio y Ramos 1983), algas verdes (Schmidt 1981; Tischner y Schmidt 1982; Florencio y Vega 1983) y plantas superiores (Rhodes *et al.* 1979), la GS inactivada por la oscuridad, por reactivos de grupos -SH o por haber suprimido del medio los ligandos estabilizadores, puede ser reactivada añadiendo diversos ditiolos tales como la tiorredoxina, el DTE, el DTT o el 2',3'-dimercapto-propanol. Los monotiololes son incapaces de producir la reactivación de la GS de *Chlorella* (Schmidt 1981), mientras que el 2-mercaptoetanol o la cisteína son capaces de aumentar 2 y 3 veces, respectivamente, la actividad de las dos GS de *Chlamydomonas* (Florencio y Vega 1983). El 2-mercaptoetanol también reactiva la GS inactiva de *Anabaena* (Sampaio *et al.* 1979). Basándose en estos resultados se ha propuesto un mecanismo de activación de la GS *in vivo* mediado por la tiorredoxina y muy sensible a los cambios luz / oscuridad, en el alga verde *Chlorella* (Tischner y Schmidt 1982). La GS de *R. capsulata* E1F1, inactivada con pHMB, también se reactiva con DTE (Figs.46 y 47). Esta reactivación no es completa de

bido a que el DTE, a concentraciones mayores de 0.1 mM, inactiva parcialmente a la GS de esta bacteria (Fig.47). El significado fisiológico de esta reactivación está menos claro que en el caso de algas verdes, ya que la actividad transferasa dependiente de  $Mn^{2+}$  en *R. capsulata* E1F1 no se ve sensiblemente afectada por la oscuridad (Fig.41) y, por tanto, no es presumible la existencia en esta bacteria de un mecanismo adicional de regulación de la GS que implique el estado de oxidación de sus numerosos grupos sulfhidrilos y que responda a los cambios luz / oscuridad.

## V. CONCLUSIONES

1. La bacteria *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 asimila el nitrógeno nítrico únicamente en condiciones fotosintéticas ( luz y anaerobiosis ).
2. La ruta preferente de asimilación del nitrógeno nítrico en *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 es la catalizada por las enzimas nitrato y nitrito reductasas, glutamina sintetasa y glutamato sintasa.
3. La nitrato y la nitrito reductasas de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 se encuentran estrechamente ligadas a sistemas de membrana, mientras que la glutamina sintetasa se solubiliza con facilidad independientemente del método de ruptura empleado.
4. La nitrato reductasa de esta bacteria es una enzima inducible por nitrato o nitrito, mientras que la nitrito reductasa y la glutamina sintetasa son enzimas adaptativas.
5. La nitrato y la nitrito reductasas de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 contienen, al parecer, molibdeno e hierro como grupos prostéticos, respectivamente. Ambas enzimas son de tipo asimilador, ya que sus productos de reacción son el  $\text{NO}_2^-$  y el  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente.

6. La glutamina sintetasa de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 se ha purificado hasta homogeneidad según criterios electroforéticos e inmunológicos, mediante cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP sefarosa.
7. La glutamina sintetasa de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 es una proteína de  $665 \pm 5$  kDa compuesta por 12 subunidades idénticas de 55 kDa cada una y posiblemente situadas en dos hexámeros superpuestos. La enzima nativa se disgrega espontáneamente en oligómeros que retienen parte de la actividad enzimática.
8. La concentración intracelular de glutamina sintetasa disminuye drásticamente en presencia de amonio y aumenta en presencia de MSX.
9. La glutamina sintetasa de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 está regulada por un mecanismo de adenilación-desadenilación. La forma adenilada es biológicamente inactiva y el grado de adenilación es máximo durante la fase estacionaria del crecimiento, en presencia de amonio o glutamina, o cuando las células se encuentran en la oscuridad.
10. El grado de adenilación de la glutamina sintetasa de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 influye en el pH óptimo de la enzima y en la dependencia de la actividad enzimática de la presencia de cationes divalentes. La actividad biosintética de la forma adenila-

da depende de  $Mn^{2+}$  y utiliza como sustrato el complejo  $MnATP^{2-}$ .

11. La actividad transferasa de la glutamina sintetasa desadenilada de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 se inhibe por L-alanina, L-glicina, L-aspartato y L-serina. La actividad biosintética se inhibe por estos aminoácidos en una proporción mucho menor.
  
12. La glutamina sintetasa de *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 contiene alrededor de 108 grupos sulfhidrilos. La enzima se inhibe por mercuriales orgánicos y se reactiva *in vitro* en presencia de ditiones, pero no está regulada por interconversión redox desencadenada por cambios luz / oscuridad.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Alef, K., Burkardt, H.-J., Horstmann, H.-J. y Zumft, W.G. (1981) Molecular characterization of glutamine synthetase from the nitrogen fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z. Naturforsch.* 36c, 246-254
- Alef, K. y Klemme, J.-H. (1977) Characterization of a soluble NADH-independent nitrate reductase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *Z. Naturforsch.* 32c, 954-956
- Alef, K. y Klemme, J.-H. (1979) Assimilatory nitrate reductase of *Rhodospseudomonas capsulata* AD2: A molybdo-hemeprotein *Z. Naturforsch.* 34c, 33-37
- Alef, K. y Zumft, W.G. (1981) Regulatory properties of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z. Naturforsch.* 36c, 784-789
- Bailey, J.L. (1967) en *Techniques in Protein Chemistry*, 2<sup>a</sup> ed., p. 340, Elsevier, Amsterdam
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. y Grassl, M. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., ed.) pp. 458-459, Verlag Chemie, Weinheim
- Bowen, H.J.M. (1966) en *Trace Elements in Biochemistry*, p. 241, Academic Press, New York
- Boyer, P.D. (1954) Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4331-4337
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

- Brewer, J.M., Pesce, A.J. y Spencer, T.E. (1974) en *Experimental Techniques in Biochemistry* (Hager, L. y Wold, F., eds.) pp. 161-215, Prentice Hall, New Jersey
- Brown, C.M. y Herbert, R.A. (1977a) Ammonia assimilation in purple and green sulphur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1, 39-42
- Brown, C.M. y Herbert, R.A. (1977b) Ammonia assimilation in members of the *Rhodospirillaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1, 43-46
- Burns, R.C. y Hardy, R.W.F. (1975) en *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants* (Kleinzeller, A., Springer, G.F. y Wittmann, H.G., eds.) pp. 61-73, Springer, Berlin
- Caballero, F.J., Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1982) Characterization of nitrate and nitrite uptake by the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. *IV International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes*, res. B12, Bombannes-Burdeos
- Cárdenas, J., Mortenson, L.E. y Yoch, D.C. (1976) Purification and properties of paramagnetic protein from *Clostridium pasteurianum* W 5. *Biochim. Biophys. Acta* 134, 244-257
- Castillo, F., Caballero, F.J. y Cárdenas, J. (1981) Nitrate photoassimilation by the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. *Z. Naturforsch.* 36c, 1025-1029
- Castillo, F. y Cárdenas, J. (1982a) Nitrate reduction by photosynthetic purple bacteria. *Photosynth. Res.* 3, 3-18
- Castillo, F. y Cárdenas, J. (1982b) Nitrite inhibition of bacterial dinitrogen fixation. *Z. Naturforsch.* 37c, 784-786
- Cawse, P.A. (1967) The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92, 311-315

- Cejudo, F.J. (1982) Caracterización del sistema de asimilación del nitrógeno inorgánico en *Rhodopseudomonas capsulata*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Sevilla
- Conway, E.J. (1962) en *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 5<sup>a</sup> ed., pp. 105-110, Crosby Lockwood, London
- Cullimore, J.V. y Sims, A.P. (1981) Pathway of ammonia assimilation in illuminated and darkened *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20, 933-940
- Chance, B.C. y Hollunger, G. (1960) Energy-linked reduction of mitochondrial pyridine nucleotides. *Nature* 185, 666-672
- Darrow, R.A. (1980) Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.) pp. 139-166, Academic Press, New York
- Darrow, R.A. y Knotts, R.R. (1977) Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 627-634
- Darrow, R.A., Knotts, R.R. y Nelson, J.L. (1982) The subunit structure of glutamine synthetases I and II from *Rhizobium japonicum*. *Charles Kettering Lab. Report 1982*, pp. 25-27, Yellow Spring, Ohio
- Davies, W. y Ormerod, J.G. (1982) Glutamine synthetase in *Chlorobium limicola* and *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 75-78
- Dutton, P.L. y Prince, R.C. (1978) Reaction-Center-Driven cytochrome interactions in electron and proton translocation and energy coupling. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 525-570, Plenum Press, New York

- Engelhardt, H. y Klemme, J.-H. (1981) *In vivo* control of glutamine synthetase in the facultative phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Z. Naturforsch.* 36c, 407-410
- Engelhardt, H. y Klemme, J.-H. (1982) Purification and structural properties of adenylylated and deadenylylated glutamine synthetase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 133, 202-205
- Falk, G., Johansson, B.C. y Nordlund, S. (1982) The role of glutamine synthetase in the regulation of nitrogenase activity ("Switch off" effect) in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 132, 251-253
- Florencio, F.J. y Ramos, J.L. (1983) Purificación y caracterización de la glutamina sintetasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. *II Congreso luso-español de Bioquímica*, res. 825, Barcelona
- Florencio, F.J. y Vega, J.M. (1983) Separation, purification, and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* 38c, 531-538
- Fuchs, R.L. y Keister, D.L. (1980a) Identification of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 141, 996-998
- Fuchs, R.L. y Keister, D.L. (1980b) Comparative properties of glutamine synthetases I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 144, 641-648
- Fuller, R.C. (1978) Photosynthetic carbon metabolism in the green and purple bacteria. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 691-705, Plenum Press, New York
- Ginsburg, A. y Stadtman, E.R. (1973) Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *The Enzymes of Glutami-*

*ne Metabolism* (Prusiner, S. y Stadtman, E.R., eds.) pp. 9-44, Academic Press, New York

- Guerrero, M.G., Vega, J.M., Leadbetter, E. y Losada, M. (1973) Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Microbiol.* 91, 287-304
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 169-204
- Guiz, C., Hirel, B., Shedlofsky, G. y Gadal, P. (1979) Occurrence and influence of light on the relative proportion of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci. Lett.* 15, 271-277
- Hedrick, J.L. y Smith, A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of protein by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164
- Herbert, R.A., Siefert, E. y Pfennig, N. (1978) Nitrogen assimilation in *Rhodospseudomonas acidophila*. *Arch. Microbiol.* 119, 1-5
- Hillmer, P. y Fahlbusch, K. (1979) Evidence for an involvement of glutamine synthetase in regulation of nitrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 122, 213-218
- Hirel, B. y Gadal, P. (1980) Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.* 66, 619-623
- Hirel, B. y Gadal, P. (1982) Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C<sub>4</sub> plant: *Sorghum vulgare* L. *Physiol. Plant.* 54, 69-74

- Hirel, B., Perrot-Rechenmann, C., Suzuki, A., Vidal, J. y Gadai, P. (1982) Glutamine synthetase in spinach leaves. Immunological studies and immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* 69, 983-987
- Ip, S.M., Rowell, P. y Stewart, W.D.P. (1983) The role of specific cations in regulation of cyanobacterial glutamine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 206-213
- Iyer, R.K., Tuli, R. y Thomas, J. (1981) Glutamine synthetases from rice: Purification and preliminary characterization of two forms in leaves and one form in roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 628-636
- Jackson, M.A., Jackson, J.B. y Ferguson, S.J. (1981) Direct observation with an electrode of uncoupler-sensitive assimilatory nitrate uptake by *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.* 136, 275-278
- Johansson, B.C. y Gest, H. (1976) Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 128, 683-688
- Johansson, B.C. y Gest, H. (1977) Adenylylation / deadenylylation control of glutamine synthetase of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 81, 365-371
- Jovin, T., Charamback, A. y Naughton, M.A. (1964) Apparatus for preparative temperature regulated polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 9, 351-364
- Kato, T. (1963a) Nitrate reductase in photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Purification and properties of the nitrate reductase in nitrate-adapted cells. *Plant Cell Physiol.* 4, 13-28
- Kato, T. (1963b) Nitrate reductase in photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Adaptive formation of nitrate reductase. *Plant Cell Physiol.* 4, 199-215

- Kaulen, H. y Klemme, J.-H. (1983) No evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the thermophilic phototropic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 75-79
- Kelley, B.C., Khanna, S. y Nicholas, D.J.D. (1980) Contribution of dissolved nitrogen in culture solutions to growth of *Rhodospseudomonas capsulata* with various sources of combined nitrogen. *Arch. Microbiol.* 127, 77-80
- Kerber, N.L., Caballero, F.J. y Cárdenas, J. (1981) Assimilatory nitrite-reductase from *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1. *FEMS Microbiol. Lett.* 11, 249-252
- Kerber, N.L. y Cárdenas, J. (1982) Nitrate reductase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 150, 1091-1097
- Ketchum, P.A. y Sevilla, C.L. (1973) *In vitro* formation of nitrate reductase using extracts of the nitrate reductase mutant of *Neurospora crassa nit-1* and *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 116, 600-609
- Khanna, S. y Nicholas, D.J.D. (1983a) Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Chlorobium vibriforme* f. *thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* 134, 98-103
- Khanna, S. y Nicholas, D.J.D. (1983b) Adenylylation of glutamine synthetase in *Chlorobium vibriforme* f. *thiosulfatophilum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 173-175
- Kleinschmidt, J.A. y Kleiner, D. (1978) The glutamine synthetase from *Azotobacter vinelandii*: Purification, characterization, regulation and localization. *Eur. J. Biochem.* 89, 51-60
- Klemme, J.-H. (1969) Studies on the mechanism of NAD-photoreduction by chromatophores of the facultative phototroph *Rhodospseudomonas capsulata*. *Z. Naturforsch.* 24b, 67-76

- Klemme, J.-H. (1979) Occurrence of assimilatory nitrate reduction in phototrophic bacteria of genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Microbiologica* 2, 415-420
- Klemme, J.-H., Czichos, J. and Wesch, R. (1981) Enzymatic mechanism and regulation of nitrate reductase in *Rhodopseudomonas capsulata*. *The Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur* (Bothe, H. y Trebst, A., eds.) pp. 225-232, Springer Verlag, Berlin
- Klemme, J.-H., Chyla, I. y Preuss, M. (1980) Dissimilatory nitrate reduction by strains of the facultative phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 137-140
- Knaff, D.B. (1978) Reducing potentials and the pathway of NAD<sup>+</sup> reduction. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 629-640, Plenum Press, New York
- Kondratieva, E.N. (1963) Pigments of photosynthetic bacteria. *Photosynthetic Bacteria* (Rabinovitz, E., ed.) pp. 64-91, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem
- Konigsberg, W.H. y Steinman, H.M. (1977) Strategy and Methods of sequence analysis. *The Proteins* (Neurath, H. y Hill, R.L., eds.) 3<sup>a</sup> ed., vol 3, pp. 1-178, Academic Press, New York
- Kretovich, V.L., Evstigneeva, Z.G., Pushkin, A.V. y Dzhokharidze, T.Z. (1981) Two forms of glutamine synthetase in leaves of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry* 20, 625-629
- Laurent, T.C. y Killander, J. (1964) A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* 14, 317-330
- Lepo, J.E., Stacey, G., Wyss, O. y Tabita, R. (1979) The purification of glutamine synthetase from *Azotobacter* and other prokaryotes by Blue Sepharose chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 568, 428-436

- Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M. y Stadtman, E.R. (1981) Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2120-2124
- Liu, T.-Y. (1977) The role of sulfur in proteins. *The Proteins* (Neurath, H. y Hill, R.L., eds.) 3<sup>a</sup> ed., vol 3, pp. 239-402, Academic Press, New York
- Losada, M., Guerrero, M.G. y Vega, J.M. (1981) The assimilatory reduction of nitrate. *The Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur* (Bothe, H. y Trebst, A., eds.) pp. 30-63, Springer Verlag, Berlin
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Lück, H. (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) pp. 886-888, Academic Press, New York
- Madigan, M. y Cox, S.S. (1982) Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 133, 6-10
- Magasanik, B. y Rothstein, D.M. (1980) The role of glutamine synthetase in the regulation of bacterial nitrogen metabolism. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.) pp. 61-68, Academic Press, New York
- Malofeeva, I.V., Bogorov, L.V. y Gogotov, I.N. (1974) Utilization of nitrates by purple bacteria. *Mikrobiologiya* 43, 967-972
- Malofeeva, I.V., Kondratieva, E.N. y Rubin, A.B. (1975) Ferredoxin-linked nitrate reductase from the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. *FEBS Lett.* 53, 188-189
- Mann, A.F., Fentem, P.A. y Stewart, G.R. (1979) Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 515-521

- Manzano, C. (1977) La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde-azulada *Anacystis nidulans*. *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) A method of determining the sedimentación behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379
- McMaster, B.J., Danton, M.S., Storch, T. y Dunham, V.L. (1980) Regulation of glutamine synthetase in the blue-green alga *Anabaena flosaquae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 975-983
- Meister, A. (1974) Glutamine synthetase of mammals. *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3<sup>a</sup> ed., vol X, pp. 699-754, Academic Press, New York
- Meister, A. (1980) Catalytic mechanism of glutamine synthetase; Overview of glutamine metabolism. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.) pp. 1-40, Academic Press, New York
- Méndez, J.M., Herrero, A. y Vega, J.M. (1981) Characterization and catalytic properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Z. Pflanzenphysiol.* 103, 305-315
- Mifflin, B.J. y Lea, P.J. (1977) Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329
- Mifflin, B.J., Lea, P.J. y Wallsgrave, R.M. (1980) The role of glutamine in ammonia assimilation and reassimilation in plants. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.) pp. 213-234, Academic Press, New York
- Mora, J., Dávila, G., Espín, G., González, A., Guzmán, J., Hernández, G., Hummelt, G., Lara, M., Martínez, E., Mora, Y. y Romero, D. (1980) Glutamine metabolism in *Neurospora crassa*. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation* (Mora, J. y Palacios, R., eds.) pp. 185-211, Academic Press, New York

- Moreno-Vivián, C. (1981) Fotoasimilación del nitrato y rutas de incorporación del amonio en la bacteria fototrófica *Rhodopseudomonas capsulata*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sevilla
- Moreno-Vivián, C., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1982) Effect of light and darkness on nitrate assimilation by *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. *Photosynth. Res.* 3, 313-319
- Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Cárdenas, J. y Castillo, F. (1983) Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1 *Arch. Microbiol.* 136, 147-151
- Notton, B.A. y Hewitt, E.J. (1979) Structure and properties of higher plant nitrate reductase, especially *Spinacea oleracea*. *Nitrogen Assimilation of Plants* (Hewitt, E.J. y Cutting, C.V., eds.) pp. 227-244, Academic Press, London
- Orr, J. y Haselkorn, R. (1981) Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 256, 13099-13104
- Orr, J. y Haselkorn, R. (1982) Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 152, 626-635
- Orr, J., Keefer, L.M., Keim, P., Nguyen, T.D., Wellems, T., Henrikson, L. y Haselkorn, R. (1981) Purification, physical characterization, and NH<sub>2</sub>-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 256, 13091-13098
- Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. (1978) en *Handbook of Experimental Immunology* (Weir, D.M., ed.) 3<sup>a</sup> ed., pp. 91.1-91.4, Blackwell Sci. Publ., Oxford
- Palacios, R. (1976) *Neurospora crassa* glutamine synthetase. Purification by affinity chromatography and characterization of subunit structure. *J. Biol. Chem.* 251, 4787-4791

- Paneque, A., Del Campo, F.F., Ramírez, J.M. y Losada, M. (1965) Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach. *Biochim. biophys. Acta* 109, 79-85
- Perales, M., Moreno-Vivián, C., Cejudo, F.J., Caballero, F.J., Castillo, F. y Gutiérrez-Navarro, A.M. (1981) Fijación de dinitrógeno y asimilación de  $\text{NH}_4^+$  por algunas estirpes de rodospiriláceas. *VIII Congreso Nacional de Microbiología*, res. 46P, Madrid
- Pfennig, N. (1978) General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 3-18, Plenum Press, New York
- Preuss, M. y Klemme, J.-H. (1983) Purification and characterization of a dissimilatory nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z. Naturforsch.* 38c, 933-938
- Ramírez, J.M., Del Campo, F.F., Paneque, A. y Losada, M. (1966) Ferredoxin-nitrite reductase from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 58-71
- Rasulov, A.S., Evstigneeva, Z.G., Kretovich, V.L., Stel'mashchuk, V.Y., Samsonidze, T.G. y Kiselev, N.A. (1977) Purification, properties and quaternary structure of glutamine synthetase from *Chlorella*. *Biokhimiya* 42, 350-358
- Reddy, D., Lancaster, J.R. y Cornforth, D.P. (1983) Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: Electron Spin Resonance detection of iron-nitric oxide complexes. *Science* 221, 769-770
- Rhodes, D., Sims, A.P. y Stewart, G.R. (1979) Glutamine synthetase and the control of nitrogen assimilation in *Lemna minor* L. *Nitrogen Assimilation of Plants* (Hewitt, E.J. y Cutting, C.V., eds.) pp. 501-520, Academic Press, London

- Roldán, J.M., Verbelen, J.P., Buttler, W.L. y Tokuyasu, K. (1982) Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 70, 872-874
- Romero, F. (1983) Estudios inmunológicos de la glutamina sintetasa de la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas capsulata*. *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Córdoba
- Ronzio, R.A. y Meister, A. (1968) Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 164-170
- Rowell, P., Sampaio, M.J.A.M., Ladha, J.K. y Stewart, W.D.P. (1979) Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity *in vivo* in response to light and  $\text{NH}_4^+$ . *Arch. Microbiol.* 120, 195-200
- Sakhno, O.N., Ivanovskii, R.N. y Kondratieva, E.N. (1981) The glutamine synthetase-glutamate synthase system in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Mikrobiologiya* 50, 607-612
- Sampaio, M.J., Rowell, P. y Stewart, W.D.P. (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
- Satoh, T. (1977) Light-activated, -inhibited and -independent denitrification by a denitrifying phototrophic bacterium. *Arch. Microbiol.* 115, 293-298
- Satoh, T. (1981) Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome *c* from a photodenitrifier *Rhodopseudomonas forma sp. denitrificans*. *Plant Cell Physiol.* 22, 443-452
- Satoh, T., Hoshino, Y. y Kitamura, H. (1976) *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 108, 265-269

- Sawada, E. y Satoh, T. (1980) Periplasmic location of dissimilatory nitrate and nitrite reductases in a denitrifying phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *Plant Cell Physiol.* 21, 205-216
- Sawada, E., Satoh, T. y Kitamura, H. (1978) Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium. *Plant Cell Physiol.* 19, 1339-1351
- Sawhney, S.K. y Nicholas, D.J.D. (1978) Some properties of glutamine synthetase from *Anabaena cylindrica*. *Planta* 139, 289-299
- Schmidt, A. (1981) A thioredoxin activated glutamine synthetase in *Chlorella*. *Z. Naturforsch.* 36c, 396-399
- Schubert, K.R. y Wolk, C.P. (1982) The energetics of biological nitrogen fixation. *Workshop Summaries I. American Society of Plant Physiologists.*
- Shapiro, B.M., Kingdon, H.S. y Stadtman, E.R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylylglutamine synthetase: A new form of the enzyme with altered regulatory and kinetic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 642-649
- Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1970) Glutamine synthetase (*E. coli*). *Methods Enzymol.* 17A, 910-922
- Siedel, J. y Shelton, E. (1979) Purification and properties of *Azotobacter vinelandii* glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 214-224
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 346-362

- Slater, J.H. y Morris, I. (1974) Light-dependent synthesis of glutamate in *Rhodospirillum rubrum*. Physiological evidence for ammonia assimilation via the glutamine synthetase and glutamine: 2-oxoglutarate aminotransferase system. *Arch. Microbiol.* 95, 337-346
- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949) en *Colorimetric Methods of Analysis*, 3<sup>a</sup> ed., vol 2, p. 804, D. Van Nostrand Reinhold, Princeton, New Jersey
- Sojka, G.A. (1978) Metabolism of nonaromatic organic compounds. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 708-718, Plenum Press, New York
- Soliman, A., Johansson, B.C., Nordlund, S. y Baltscheffsky, H. (1982) Two glutamine synthetases from *Rhodospirillum rubrum*? *IV International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes*, res. B6, Bombannes, Burdeos
- Soliman, A., Nordlund, S., Johansson, B.C. y Baltscheffsky, H. (1981) Purification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* by affinity chromatography. *Acta Chem. Scand.* 35, 63-64
- Stacey, G., Van Baalen, C. y Tabita, F.R. (1979) Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: regulation of glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 457-467
- Stadtman, E.R. y Ginsburg, A. (1974) The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3<sup>a</sup> ed., vol X, pp. 755-807, Academic Press, New York
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M. y Adelberg, E.A. (1971) en *General Microbiology*, 3<sup>a</sup> ed., pp. 686-705, Prentice Hall, New Jersey
- Stewart, G.R. y Rhodes, D. (1977) Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. *Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants* (Smith, H., ed.) pp. 1-19, Academic Press, New York

- Taniguchi, S. y Kamen, M.D. (1963) On the nitrate metabolism of the facultative photoheterotrophs. *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria* (Japan Soc. Plant Physiol., eds.) pp. 465-484, University of Tokyo Press, Tokyo
- Tate, S.S. y Meister, A. (1973) Glutamine synthetases of mammalian liver and brain. *The Enzymes of Glutamine Metabolism* (Prusiner, S. y Stadtman, E.R., eds.) pp. 77-128, Academic Press, New York
- Tischner, R. y Hüttermann, A. (1980) Regulation of glutamine synthetase by light and during nitrogen deficiency in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 66, 805-808
- Tischner, R. y Schmidt, A. (1982) A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 70, 113-116
- Tolxdorff-Neutzling, R.T. y Klemme, J.-H. (1982) Metabolic role and regulation of L-alanine dehydrogenase in *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 155-159
- Trinchant, J.C. y Rigaud, J. (1980) Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.* 124, 49-54
- Trüper, H.G. y Pfennig, N. (1978) Taxonomy of the Rhodospirillales. *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K. y Sistrom, W.R., eds.) pp. 19-27, Plenum Press, New York
- Tuli, R. y Thomas, J. (1981) *In vivo* regulation of glutamine synthetase by ammonium in the cyanobacterium *Anabaena* L-31. *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 181-189
- Tyler, B. (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162
- Valentine, R.C., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1968) Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 7, 2143-2152

- Vega, J.M., Cárdenas, J. y Losada, M. (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods Enzymol.* 69, 255-270
- Villalobo, A., Roldán, J.M., Rivas, J. y Cárdenas, J. (1977) Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Microbiol.* 112, 127-132
- Weaver, P.F., Wall, J.D. y Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 105, 207-216
- Wedler, F.C., Shreve, D.S., Kenney, R.M., Ashour, A.E., Carfi, J. y Rhee, S.G. (1980) Two glutamine synthetases from *Bacillus caldolyticus*, an extreme thermophile. Isolation, physicochemical and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 255, 9507-9516
- Weeke, B. (1973a) en *A manual of quantitative immunoelectrophoresis* (Axelsen, N.H., Kroll, J. y Weeke, B., eds.) pp. 37-46, universitetsforlaget, Oslo
- Weeke, B. (1973b) en *A manual of quantitative immunoelectrophoresis* (Axelsen, N.H., Kroll, J. y Weeke, B., eds.) pp. 47-56, Universitetsforlaget, Oslo
- Wesch, R. y Klemme, J.-H. (1980) Catalytic and molecular differences between assimilatory nitrate reductases isolated from two strains of *Rhodopseudomonas capsulata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 8, 37-41
- Woolfolk, C.A., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1966) Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 177-192
- Woolfolk, C.A. y Stadtman, E.R. (1967) Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 736-755

- Yoch, D.C., Cantu, M. y Zhang, Z.-M. (1983) Evidence for a glutamine synthetase-chromatophore association in the phototroph *Rhodospirillum rubrum*: Purification, properties, and regulation of the enzyme. *J. Bacteriol.* 154, 632-639
- Zannoni, D. e Ingledew, J.W. (1983a) *Rhodopseudomonas capsulata* respiratory dehydrogenase mutants: an Electron Paramagnetic Resonance study. *FEMS Microbiol. Lett.* 17, 331-334
- Zannoni, D. e Ingledew, J.W. (1983b) A functional characterization of the membrane bound iron sulphur centres of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 135, 176-181
- Zumft, W.G. y Cárdenas, J. (1979) The inorganic biochemistry of nitrogen bioenergetic processes. *Naturwissenschaften* 66, 81-88
- Zumft, W.G. y Castillo, F. (1978) Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* 117, 53-60
- Zumft, W.G., Castillo, F. y Hartmann, K.M. (1980) Flavin-mediated photoreduction of nitrate by nitrate reductase of higher plants and microorganisms. *The Blue Light Syndrome* (Senger, H., ed.) pp. 422-428, Springer Verlag, Berlin

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Francisco Javier Caballero Dominguez  
titulada "Caracterización y propiedades de la vitato reducida  
laxa, vitato reducida y glutamina sintetasa de la b  
teria fototrófica Rhodospseudomonas capsulata E1E1."  
acordó otorgarle la calificación de honorablemente  
cum laude

Sevilla, 13 de abril 1984

El Vocal,

F. Colocera

El Presidente,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

F. M. Vela

El Doctorado,

[Signature]