

REGULACION DE LA EXPRESION  
DE ENZIMAS DE LA ASIMILACION  
DE NITROGENO  
EN PLANTAS SUPERIORES

Purificación Pajuelo Domínguez

Sevilla, 1997

TD

232



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Regulación de la expresión de los genes de la señalización de nichos en células progenitoras sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Purificación Pajuelo Domínguez et.

Firmado:

Sevilla, a 23 de Marzo de 1998

72 192  
Sevilla

16 OCT. 1997

El jefe del registro de la casa,

deuabfflo

R. 15992



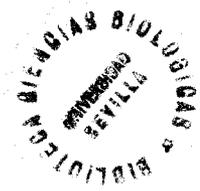
**REGULACION DE LA EXPRESION DE ENZIMAS DE LA  
ASIMILACION DE NITROGENO EN PLANTAS**

**PURIFICACION PAJUELO DOMINGUEZ**

**Universidad de Sevilla**

***Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular***

R.15992.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

REGULACION DE LA EXPRESION DE ENZIMAS DE LA  
ASIMILACION DE NITROGENO EN PLANTAS SUPERIORES

Trabajo realizado para optar al grado de Doctora en Ciencias  
Biológicas por la Licenciada

A handwritten signature in black ink, appearing to be "P. Pajuelo".

Purificación Pajuelo Domínguez

Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Antonio J. Márquez", enclosed within a large, hand-drawn circle.

Dr. Antonio J. Márquez Cabeza  
Prof. Titular de Bioquímica y Biología Molecular

*Nuestras horas son minutos  
cuando esperamos saber,  
y siglos cuando sabemos  
lo que se puede aprender.*

*Antonio Machado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Antonio J. Márquez quiero expresar mi más sincero agradecimiento por haberme acogido en su grupo de investigación, y su dedicación en la labor de dirección y orientación del trabajo, así como su constante gestión para la obtención de financiación de la investigación.

Especialmente deseo expresar mi más profunda gratitud a Eloísa, que fue quien me inició en este camino de la investigación, y con quien he compartido tan buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Siempre he podido contar con ella para discusiones y orientaciones en el trabajo, y su positivismo es algo que me ha ayudado mucho.

A Alicia, que me ha ayudado tanto en la realización de algunos experimentos y que ha mostrado una paciencia infinita conmigo en las discusiones de sobremesa en los últimos tiempos. También a Teresa (esta vez sí te llamo por tu nombre), que siempre me ha dado consejos acertados y me ha animado tanto en esta última etapa del trabajo. A María José quiero agradecer su dedicación en el trabajo de fotografía, y su apoyo en las tareas de laboratorio. Durante mi permanencia en el departamento he podido entablar con ellas una amistad que espero podamos mantener por mucho tiempo.

A los compañeros de mis primeros años, especialmente a José Antonio B., Javi, Frank, Jorge y José Manuel, con quienes fue tan agradable el trabajo en el laboratorio, y también a Rosa, Conchita, Cristina, Ana, Carmen y Curro, por su grata compañía durante este tiempo. Deseo expresar asimismo mi agradecimiento a José Antonio, por su colaboración en los últimos experimentos de esta Tesis, y su entusiasmo y ánimo de aprender.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Brian G. Forde (IACR-Rothamsted, Harpenden, Herts, U.K.) por la cesión de las estirpes mutantes fotorrespiratorias de cebada, agradeciéndole las orientaciones en relación con algunos aspectos del trabajo y las discusiones científicas. Asimismo deseo hacer extensivo mi agradecimiento al Profesor David Clarkson y al Dr. Ian Prosser (IACR-Long Ashton, Bristol, U.K.) por la cesión de los anticuerpos monoclonales de la NR de espinaca, los esquejes de plantas transgénicas, así como las discusiones científicas. A los Dres. Jens Stougaard (Universidad de Aarhus, Dinamarca) Bertrand Hirel (INRA-Versalles, Francia) y Michael Caboche les agradezco por colaboraciones puntuales con mi trabajo y discusiones científicas, y al Profesor Mark Stitt y al Dr. W.R. Scheible (Botanische Institut Der Universit Heidelberg, Alemania) por la cesión de los anticuerpos anti-NR de tabaco.

A otras personas fuera del laboratorio quiero expresar también mi agradecimiento. Entre ellas, especialmente deseo expresar mi más sincera gratitud a Miguel Angel. El siempre me ha alentado, y ha estado cerca de mis agobios de tantos días en estos últimos meses, y su ayuda es de un valor inestimable para mí. También a mi familia, a quienes he tenido abandonados últimamente. A mi hermana María, que siempre fue comprensiva conmigo y me prestó su ayuda cuando más necesité. A mis papás adoptivos de estos últimos meses, Manolo y Robledo, deseo expresarles mi más profundo agradecimiento, porque me han ayudado en todo lo que estaba en sus manos, y me han soportado con paciencia. También a Manolo, el hermano de Miguel Angel, por su apoyo y sus consejos en las cuestiones informáticas.

Finalmente quiero agradecer a todo aquello que me ha dado la oportunidad de aprender, ... no sólo un poco de Bioquímica.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a la financiación personal por parte de los proyectos de investigación: BIO 2-CT93-0400, del programa BIOTECH de la Unión Europea, y a las Ayudas al Grupo de Investigación CVI 0163 de la Junta de Andalucía. La financiación de la investigación ha sido gracias a los proyectos de investigación anteriores, así como los proyectos de investigación BP 91-0613 y BP94-1192, de la DGICYT (MEC), y BIO 95-1107-CE de la CICYT (Plan Nacional de Investigación Científica y Técnica), siendo en todos los casos investigador responsable el Dr. Antonio J. Márquez.

La concesión de una Ayuda para Infraestructura (IN93-0358) ha permitido disponer de una cámara de cultivo de plantas SANYO SGR193.S26A, agradeciendo al Profesor D. Vicente Flores Luque, por entonces Decano de la Facultad de Química, el permiso para su instalación en esta facultad.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

## 1. Publicaciones:

- 1.1. **Análisis molecular de mutantes fotorrespiratorios de cebada deficientes en la biosíntesis de glutamato.** A.J. Márquez; J. Freeman; C. Avila; R.M. Wallsgrove; P. Pajuelo; E. Pajuelo; B.G. Forde. (1992). En *Metabolismo del Nitrógeno* (M. Pineda y F. Castillo, Eds.) Sociedad Española de Bioquímica, pp. 140-144.
- 1.2. **Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme.** C. Avila; A.J. Márquez; P. Pajuelo; M.E. Cannell; R.M. Wallsgrove; B.G. Forde. (1993). *Planta*, **189**, 475-483.
- 1.3. **Expresión durante el desarrollo de la ferredoxina-glutamato sintasa de cebada.** P. Pajuelo; E. Pajuelo; A.J. Márquez. (1995). En *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno* (M. García Guerrero, Ed.) Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones, pp. 121-128.
- 1.4. **Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley.** P. Pajuelo; E. Pajuelo; B.G. Forde; A.J. Márquez. (*Planta*, en prensa).

## 2. Comunicaciones a Congresos:

- 2.1. **Studies at the protein and mRNA level on the ferredoxin-glutamate synthase from leaves and roots of wild type and mutant barley lines.** P. Pajuelo; E. Pajuelo; C. Avila; B.G. Forde; A.J. Márquez. IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress, Comunicación oral (Abstract A3-We, p. 6), Póvoa de Varzim, Portugal, 1991.
- 2.2. **Análisis molecular de mutantes fotorrespiratorios deficientes en glutamato sintasa.** A.J. Márquez; P. Pajuelo; E. Pajuelo; C. Avila; B.G. Forde. I Reunion Nacional "Grupo del Metabolismo del Nitrógeno", Sociedad Española de Bioquímica Y Sociedad Española de Fisiología Vegetal, resumen p. 53, Málaga, 1992.

- 2.3. **Biología molecular de la ferredoxina-glutamato sintasa de cebada.** P. Pajuelo; A.J. Márquez. XVIII Congreso Nacional de Bioquímica, SEB 93, Comunicación oral invitada (resumen GN.18, p. 41), San Sebastian, 1993.
- 2.4. **The nitrate reductase from a model legume plant: *Lotus japonicus*.** E. Pajuelo; J.L. González-Vicente; P. Pajuelo; A.J. Márquez. V Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry, Abstract P-VI-24, p. 186. Salamanca, 1994.
- 2.5. **Isolation of mutants from *Lotus japonicus* affected in nitrate assimilation.** A.J. Márquez; E. Pajuelo; P. Pajuelo; J.L. González-Vicente; J.M. Romero; A. Orea. Nitrogen Utilisation Efficiency. Meeting of EC Project of Technological Priority. Themes D1 and D2., Comunicación oral, Harpenden, U.K., 1994.
- 2.6. **Distintas aproximaciones al estudio de la asimilación de nitrógeno en vegetales.** A.J. Márquez; E. Pajuelo; J. A. Borrero; P. Pajuelo; T. Clemente; A. Orea; J.M. Romero. XIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y I Reunión con la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Comunicación oral, (Abstract PVIII.1, p. 157), Córdoba, 1995.
- 2.7. **Asimilación de nitrato en *Lotus japonicus*.** E. Pajuelo; P. Pajuelo; A. Orea; J.M. Romero; A.J. Márquez. XIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y I Reunión con la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Abstract PVIII.2, p. 157, Córdoba, 1995.
- 2.8. **Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*: screening for EMS-induced mutants and other complementary studies.** A.J. Márquez; E. Pajuelo; P. Pajuelo; A. Orea; J.M. Romero, T. Clemente. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting on Nitrogen Utilization Efficiency (Themes D1 and D2). Sevilla, 1995.
- 2.9. **Nitrate assimilation in *Lotus japonicus* (I). General aspects, mutant screening and cloning of nitrite reductase.** A. Orea; P. Pajuelo; C. Quidiello; E. Pajuelo; A.J. Márquez; J.M. Romero. 10<sup>th</sup> FESPP Congress (Federation of European Societies of Plant Physiology), Abstract S11-40, Florencia, Italia, 1996.
- 2.10. **Nitrate assimilation in *Lotus japonicus* (II). Evidence for the presence of a root nitrate reductase inactivating factor.** P.

Pajuelo; E. Pajuelo; A. Orea; J.M. Romero; A.J. Márquez. 10<sup>th</sup> FESPP Congress (Federation of European Societies of Plant Physiology), Abstract S11-44, Florencia, Italia, 1996.

- 2.11. **Investigating the regulation of the nitrate assimilatory pathway in the model legume *Lotus japonicus* through genetic manipulation and mutagenesis (Theme D2. Part 04).** A.J. Márquez, P. Pajuelo; A. Orea; C. Quidiello; E. Pajuelo; J.M. Romero; T. Clemente. Phytosfere' 97 (Plant technology transfer events and European Union Final PTP meeting), Dublin, Irlanda, 1997.

## ABREVIATURAS

$A_{\lambda}$	absorbancia a longitud de onda $\lambda$
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP	dCTP marcado radiactivamente en el fosfato de posición $\alpha$
ABTS	2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolín-sulfonato]
AMP	adenosín 5'-monofosfato
ATP	adenosín 5'-trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
Bis-arilamida	N,N'-metilén-bis-acrilamida
BSA	seroalbúmina bovina
cDNA	ácido desoxiribonucleico copia
Ci	curio
cpm	cuentas por minutos
$\Delta A$	incremento de absorbancia
Da	dalton
dATP	2'-desoxiadenosín-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidín-5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
Denhardt	ficoll (Tipo 400) al 0,02% (p/v); PVP al 0,02% (p/v); BSA al 0,02% (p/v)
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanoxín-5'-trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTE	ditioeritritol (eritro-1,4-dimercapto-2,3-ditiol)
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimercapto-2,3-ditiol)
dTTP	2'-desoxitimidín-5'-trifosfato
$\epsilon$	coeficiente de extinción
E	einstein
EDTA	ácido etilén-diamino-tetraacético
ELISA	inmunoensayo enzimático
FAD	flavín adenín dinucleótido
FB	MOPS 20 mM, pH 7,0; ácido acético 8 mM; EDTA 1 mM
Fd	ferredoxina
FMN	Flavín mononucleótido
FNR	ferredoxina-NADP <sup>+</sup> -reductasa
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
Gln	glutamina
GOGAT	glutamato sintasa (glutamina-oxoglutarato aminotransferasa)
Grado BM	grado de biología molecular
GS	glutamina sintetasa
h	hora
<i>h</i>	altura de las columnas cromatográficas
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil] piperacina N'-[etanosulfónico]
IgG	inmunoglobulina G
kat	unidad de actividad enzimática
kb	kilobase
mA	miliamperio

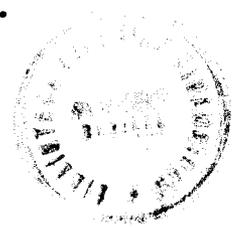
min	minuto
MoCo	cofactor de molibdopterina
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MV	metil viológeno
MV <sup>o+</sup>	metil viológeno reducido
<i>n x y</i>	solución y a <i>n</i> veces su concentración
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	azul de nitrotetrazolio
NiR	nitrito reductasa
NR	nitato reductasa
Ø	diámetro de las columnas cromatográficas
2-OGA	2-oxoglutarato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	fosfato potásico 20 mM, pH 7,2; NaCl 0,15 M
PF	peso fresco de material
PGP	fosfoglicolato fosfatasa
PMS	fenazina metosulfato
PMSF	fluoruro de fenilmetano sulfonilo
polyA <sup>+</sup> -RNA	ácido ribonucleico poliadenilado
PVDF	Polivinilfluoruro
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	polivinilpolipirrolidona
rDNA	cDNA correspondiente al rRNA 18 S
rRNA	ácido ribonucleico ribosómico
RNA	ácido ribonucleico
Rubisco	ribulosa 1,5-bifosfato acarboxilasa/oxigenasa
Sarcosil	N-lauril sarcosina
SDS	dodecil sulfato sódico
SSC	NaCl 150 mM; citrato sódico 15 mM
SSPE	fosfato potásico 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM
TBS	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TNE	Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM
TPBS	TBS suplementado con Tween 20 al 0,1% (v/v)
Tris (Trizma base)	tris-(hidroximetil)-amino metano
tritón X-100	t-octilfenoxipolietoxietanol
TTBS	TBS suplementado con Tween 20 al 0,25 % (v/v)
Twenn 20	polioxietilén sorbitan monolaurato
U	unidad de actividad enzimática

# INDICE

<b><i>INTRODUCCION.</i></b>	1
<b>1. LA ASIMILACION DE NITROGENO HASTA AMINOACIDOS EN PLANTAS SUPERIORES.</b>	3
<b>1.1. Asimilación primaria de nitrato.</b>	4
1.1.1. Transporte de nitrato al interior celular.	6
1.1.2. Reducción de nitrato hasta amonio.	6
1.1.2.1. Nitrato reductasa.	6
1.1.2.2. Nitrito reductasa.	8
1.1.3. Asimilación de amonio hasta aminoácidos.	9
1.1.3.1. Glutamina sintetasa.	9
1.1.3.2. Glutamato sintasa.	10
<b>1.2. Asimilación de amonio fotorrespiratorio.</b>	12
<b>1.3. Asimilación de amonio derivado del reciclaje de nitrógeno.</b>	13
<b>2. LA REGULACION DE LA ASIMILACION DE NITROGENO.</b>	14
<b>2.1. Regulación de la Nitrato reductasa.</b>	14
<b>2.2. Regulación de la Fd-GOGAT.</b>	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	20
<b><i>MATERIALES Y METODOS.</i></b>	25
<b>1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.</b>	25
<b>1.1. Organismos.</b>	25

1.2.	Condiciones de cultivo.	25
2.	PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS.	30
2.1.	Obtención de extractos crudos de hojas y raíces de cebada.	30
2.2.	Obtención de extractos crudos de hojas y raíces de <i>L. japonicus</i> .	31
2.3.	Obtención de extractos crudos de hojas de espinaca.	31
2.4.	Obtención de extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i> .	32
3.	FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS CRUDOS.	32
3.1.	Fraccionamiento de extractos crudos mediante filtración	32
3.2.	Fraccionamiento de extractos crudos mediante precipitación con sulfato amónico.	33
3.3.	Diálisis.	33
3.3.1.	Microdiálisis.	33
3.3.2.	Diálisis por filtración en Sefadex G-25.	34
3.4.	Precipitación de proteínas con TCA.	34
4.	DETERMINACIONES ANALITICAS.	34
4.1.	Determinación de proteína.	34
4.2.	Determinación de nitrato.	35
4.3.	Determinación de glutamato.	35
4.4.	Determinación de nitrato.	36
4.5.	Determinación espectrofotométrica de NADH	36

4.6.	Cuantificación espectrofotométrica de la concentración de RNA.	36
5.	ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	36
5.1.	Actividad Fd-glutamato sintasa.	36
5.2.	Actividad NADH-nitrato reductasa.	37
5.3.	Actividad nitrito reductasa.	39
6.	PURIFICACION DE PROTEINAS.	39
6.1.	Purificación parcial de la NADH-nitrato reductasa de raíces de <i>L. japonicus</i> .	39
6.2.	Purificación de ferredoxina de <i>C. reinhardtii</i> .	39
7.	TECNICAS ELECTROFORETICAS.	40
7.1.	Electroforesis de proteínas.	40
7.1.1.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	40
7.1.2.	Electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida (4-15%).	41
7.1.3.	Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	42
7.1.4.	Determinación de la masa molecular de proteínas por SDS-PAGE.	42
7.2.	Electroforesis de RNA.	43
7.2.1.	Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehido.	43
7.2.2.	Determinación del tamaño de las bandas de RNA.	43
8.	TECNICAS INMUNOQUIMICAS.	44



<b>8.1. Preparación de anticuerpos anti-péptidos de la NADH-nitrato reductasa de <i>L. japonicus</i>.</b>	<b>44</b>
<b>8.2. Inmunoinhibición de la actividad Fd-GOGAT con anticuerpos específicos.</b>	<b>44</b>
<b>8.3. Inmunodetección de proteínas en filtro (“immunoblotting o western blotting”).</b>	<b>45</b>
8.3.1. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros.	45
8.3.2. Tinción de proteínas en filtro.	46
8.3.3. Inmunodetección específica de la Fd-GOGAT con anticuerpos en filtro.	46
8.3.4. Inmunodetección específica de la NADH-nitrato reductasa en filtros.	47
<b>8.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA).</b>	<b>48</b>
8.4.1. ELISA positivo con anticuerpos anti-Fd-GOGAT.	48
8.4.2. ELISA positivo con antisueros anti-péptidos de la NADH-nitrato reductasa.	49
<b>9. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.</b>	<b>50</b>
<b>9.1. Aislamiento de RNA total de hojas y raíces de cebada.</b>	<b>50</b>
9.1.1. Método de Jepson et al. (1991).	51
9.1.2. Método de Chomczynsky y Sacchi (1987).	51
<b>9.2. Hibridación de RNA en filtros.</b>	<b>52</b>
9.2.1. Transferencia de RNA desde geles de agarosa-formaldehido a filtros de nylon.	52
9.2.2. Marcaje radiactivo de sondas.	53

9.2.3. Condiciones de hibridación.	53
9.2.4. Rehibridación de filtros.	54
<b>10. REACTIVOS Y APARATOS.</b>	<b>54</b>
<b>10.1. Reactivos.</b>	<b>54</b>
<b>10.2. Aparatos.</b>	<b>55</b>
<b>10.3. Otros materiales</b>	<b>58</b>

## ***RESULTADOS Y DISCUSION I.***

### ***REGULACION DE LA EXPRESION DE LA FERREDOXINA-GLUTAMATO SINTASA DE CEBADA.***

<b>1. EXPRESION DE LA Fd-GOGAT EN HOJAS Y RAICES DE CEBADA.</b>	<b>61</b>
<b>1.1. Niveles de expresión de la Fd-GOGAT en hojas y raíces de plantas maduras de cebada.</b>	<b>61</b>
<b>1.2. Comparación inmunológica de la enzima Fd-GOGAT en hojas y raíces de cebada.</b>	<b>64</b>
<b>2. PROTEOLISIS DE LA Fd-GOGAT EN EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS Y RAÍCES DE CEBADA.</b>	<b>65</b>
<b>3. CAMBIOS EN LA EXPRESION DE LA Fd-GOGAT DURANTE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CEBADA.</b>	<b>72</b>
<b>4. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA EXPRESION DE LA Fd-GOGAT DE CEBADA.</b>	<b>79</b>
<b>4.1. Efecto de la luz sobre la expresión de la Fd-GOGAT durante la iluminación de plantas etioladas.</b>	<b>79</b>
<b>4.2. Expresión de la Fd-GOGAT durante el fotoperiodo.</b>	<b>85</b>
<b>4.3. Expresión de la Fd-GOGAT tras un período de oscuridad prolongada.</b>	<b>87</b>

<b>5. EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE NITROGENO SOBRE LA EXPRESION DE LA Fd-GOGAT DE CEBADA.</b>	<b>89</b>
<b>6. EXPRESION DE LA Fd-GOGAT EN MUTANTES FOTORRESPIRATORIOS DE CEBADA.</b>	<b>92</b>
<b>7. DISCUSION CONJUNTA DE LOS ESTUDIOS DE REGULACION DE LA Fd-GOGAT EN CEBADA.</b>	<b>97</b>

***RESULTADOS Y DISCUSION II.*** **99**

**EXPRESION DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE *Lotus japonicus*.** **101**

**1. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE *L. japonicus*.** **101**

**2. EXPRESION DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA EN RAICES DE *L. japonicus*.** **105**

**2.1. Influencia de la edad y/o condiciones de cultivo de las plantas.** **105**

**2.2. Estudio de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa en presencia de cationes  $Mg^{2+}$  (sistema reversible de fosforilación).** **109**

**2.3. Análisis de la presencia de factores inactivantes de la NADH-nitrato reductasa en extractos crudos de raíces, aparentemente no relacionados con el mecanismo de fosforilación reversible.** **112**

**2.4. Expresión de la NADH-nitrato reductasa en raíces de plantas cultivadas en amonio.** **121**

**3. EXPRESION DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA EN HOJAS DE *L. japonicus*.** **125**

**3.1. Análisis de la presencia de factores inactivantes de la NADH-nitrato reductasa en extractos crudos de hojas de *L. japonicus*.** **126**

<b>3.2. Expresión de la NAH-nitrato reductasa en plantas transgénicas de <i>L. japonicus</i> con expresión de la NADH-nitrato reductasa de espinaca bajo el promotor <i>cab</i>.</b>	132
<b><i>CONCLUSIONES.</i></b>	137
<b><i>BIBLIOGRAFIA.</i></b>	143

## ***INTRODUCCION***

# 1. LA ASIMILACION DE NITROGENO HASTA AMINOACIDOS EN PLANTAS SUPERIORES.

El nutriente mineral necesitado en mayor abundancia por los vegetales es el nitrógeno. La asimilación de nitrógeno tiene un marcado efecto sobre la productividad de las plantas, su biomasa y el rendimiento de las cosechas (Lam et al., 1996), y constituye un proceso clave del ciclo del nitrógeno en la biosfera (Fig.1). La provisión de nitrógeno en una forma asimilable es frecuentemente el principal factor limitante del crecimiento de las plantas. Estas deben competir por el nitrógeno en el suelo con procesos bióticos, como es su consumo por microorganismos, así como abióticos, como es la erosión y lavado (Crawford, 1995). En agricultura, es frecuente el uso de fertilizantes con nitrato para aumentar el rendimiento de las cosechas. Los fertilizantes amoniacales son también convertidos rápidamente en nitrato por la flora bacteriana nitrificante. El alto nivel de nitrato en los suelos y su lavado ha constituido en los últimos tiempos un motivo de preocupación a nivel mundial, debido a que plantea problemas a nivel económico, ecológico y sanitario. Es por ello que la investigación en la asimilación de nitrógeno es de interés no sólo agrícola y económico, sino también en una dimensión ecológica e incluso política (Campbell y Kinghorn, 1990).

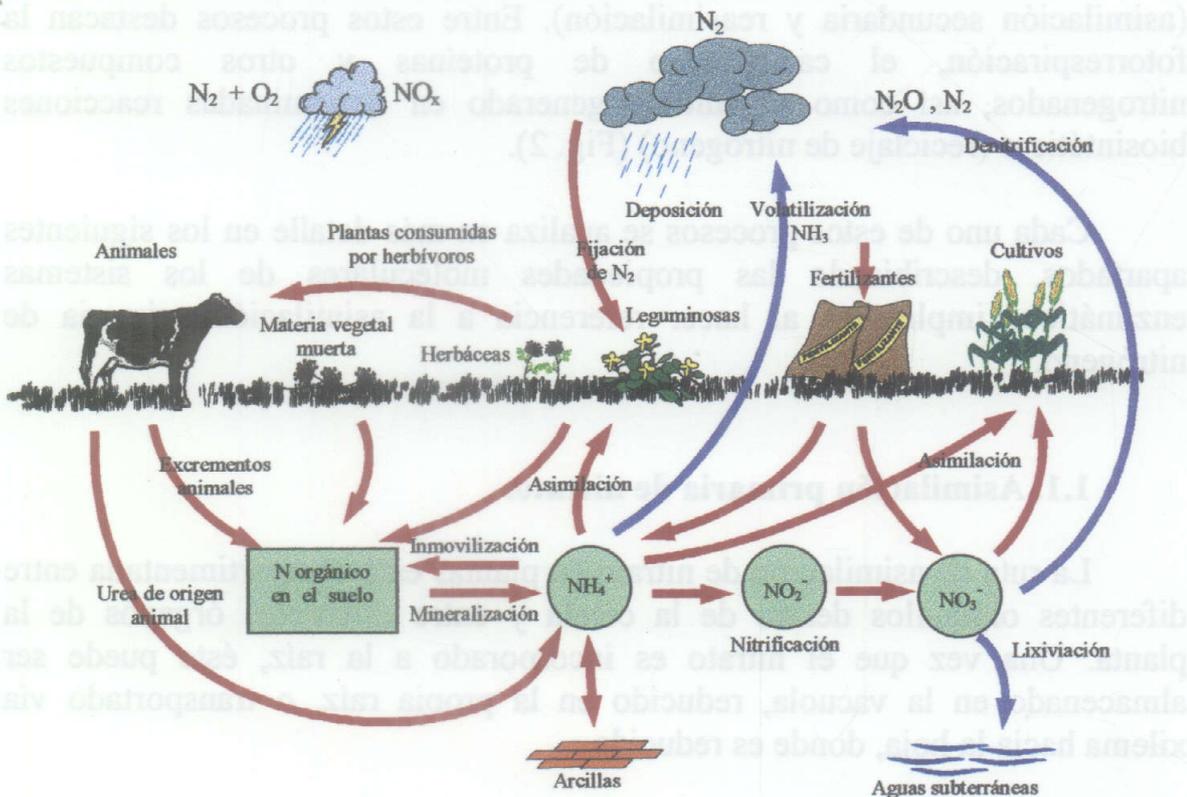


Fig.1. Ciclo del nitrógeno en la biosfera.

Algunas bacterias, hongos, algas y plantas obtienen el nitrógeno a partir de la reducción en dos etapas del nitrato hasta amonio. Se ha estimado que más de  $10^{10}$  toneladas de nitrato son asimiladas hasta amonio por estos organismos cada año (Guerrero et al., 1981). Aunque las plantas pueden usar como fuente de nitrógeno inorgánico nitrato o amonio, el primero constituye la forma disponible de nitrógeno más común en los suelos, debido a la ubicuidad en éstos de los microorganismos antes referidos (e.g. especies de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*), capaces de convertir el amonio en nitrato (Oaks, 1992). Por otro lado, un grupo especializado de plantas (e.g. especies de leguminosas y de los géneros *Alnus* y *Casuarina*) puede obtener el nitrógeno gracias a la capacidad que han desarrollado de establecer relaciones simbióticas con microorganismos fijadores de dinitrógeno (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y especies de actinomicetos) (Oaks, 1992). La fijación de dinitrógeno es 100 veces inferior al valor estimado de la asimilación de nitrato (Gallon y Chaplin, 1987). Cuando a este tipo de plantas se les suministra nitrato lo utilizan preferencialmente, no desarrollando el proceso de fijación de dinitrógeno, excepto en mutantes supernodulantes o tolerantes a nitrato (Vessey y Waterer, 1992).

Junto con la reducción de nitrato hasta amonio (asimilación primaria de nitrógeno), hay otros procesos en el interior de los vegetales en los que se genera amonio que es necesario reasimilar por el vegetal (asimilación secundaria y reasimilación). Entre estos procesos destacan la fotorrespiración, el catabolismo de proteínas y otros compuestos nitrogenados, así como el amonio generado en determinadas reacciones biosintéticas (reciclaje de nitrógeno) (Fig. 2).

Cada uno de estos procesos se analiza en más detalle en los siguientes apartados, describiendo las propiedades moleculares de los sistemas enzimáticos implicados al hacer referencia a la asimilación primaria de nitrógeno.

### **1.1. Asimilación primaria de nitrato.**

La ruta de asimilación de nitrato en plantas está compartimentada entre diferentes orgánulos dentro de la célula y entre diferentes órganos de la planta. Una vez que el nitrato es incorporado a la raíz, éste puede ser almacenado en la vacuola, reducido en la propia raíz, o transportado vía xilema hacia la hoja, donde es reducido.

Hay distintos tipos de plantas en este sentido: a) En las plantas no leguminosas y leguminosas tropicales la reducción de nitrato ocurre mayoritariamente en las hojas, donde están directamente disponibles el carbono, el poder reductor y la energía necesarios, independientemente de la concentración de nitrato en el suelo. b) Sin embargo, las plantas no leguminosas perennes y leguminosas anuales de los climas templados parecen haber desarrollado mecanismos adaptativos especiales, ya que en éstas, cuando crecen en suelos no agrícolas, la reducción de nitrato tiene lugar mayoritariamente en las raíces. A altas concentraciones de nitrato, la proporción de nitrato reducido en las hojas de estas plantas aumenta. c) Un tercer grupo de plantas está constituido por aquellas en que la reducción de nitrato se lleva a cabo tanto en hojas como en raíces (plantas anuales no leguminosas de los climas templados). La proporción de nitrato que es reducida en uno u otro órgano puede variar en las mismas especies de plantas no sólo en respuesta a la concentración de nitrato en el suelo, sino también a otros factores externos o internos. (Andrews, 1986; Oaks, 1992).

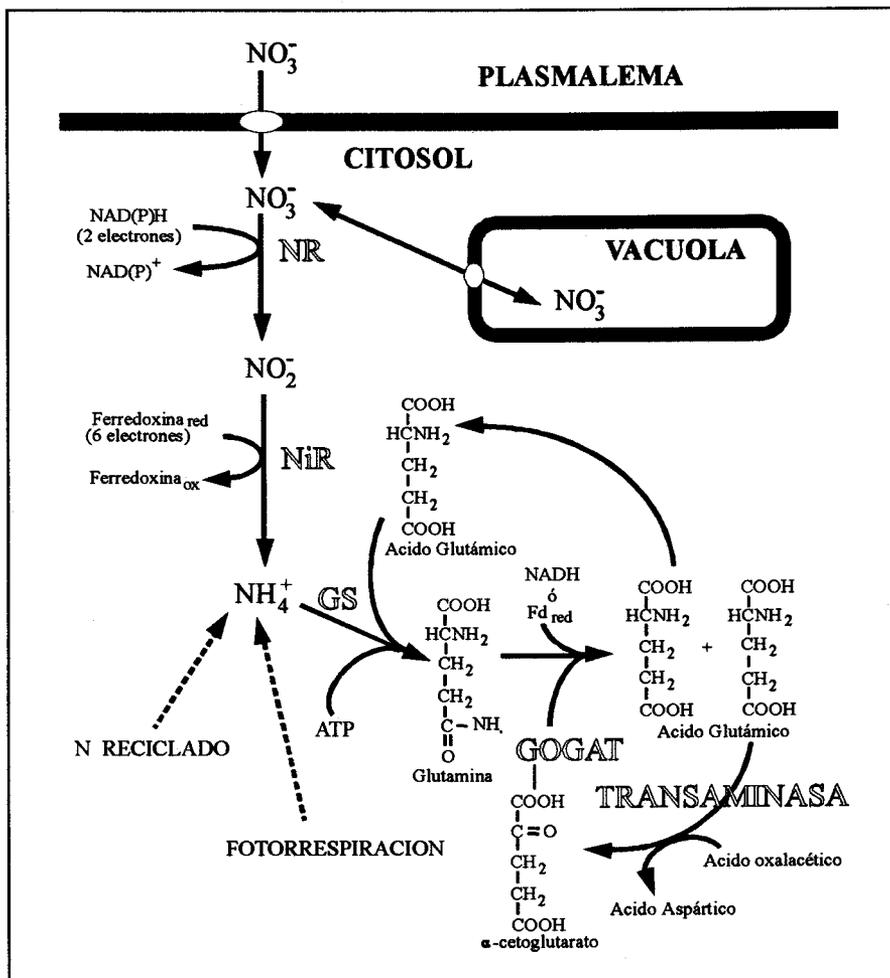


Fig. 2. Ruta de asimilación primaria de nitrato y reasimilación de amonio. (Modificado de Daniel-Vedele y Caboche, 1996)

Las etapas fundamentales de la asimilación de nitrato a nivel celular son: transporte de nitrato al interior celular, reducción de nitrato hasta amonio, y asimilación de amonio hasta aminoácidos.

### 1.1.1. Transporte de nitrato al interior celular.

Las plantas deben adquirir una cantidad óptima de nitrato en un ambiente donde la concentración de nitrato en el suelo puede variar entre concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  a 100 mM. Para ser competitivas en estas condiciones, las plantas han desarrollado un sistema de transporte de nitrato versátil, activo y regulado (Crawford, 1995).

El nitrato es inicialmente transportado a través de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz (Larsson y Ingemarsson, 1989). Varias evidencias sugieren que el transporte de nitrato al interior de la raíz se produce en contra de un gradiente de potencial electroquímico y que está acoplado al cotransporte electrogénico de 2 ó más protones, produciéndose una despolarización transitoria de la membrana plasmática y la alcalinización del medio externo. Las plantas presentan dos tipos de sistemas de transporte con distinta afinidad por el nitrato. Por un lado, los denominados sistemas de alta afinidad son sistemas que operan a concentraciones de nitrato externas bajas (por debajo de 0,5-1 mM). Por otro lado, las plantas presentan también sistemas de transporte de nitrato de baja afinidad, que opera a concentraciones superiores a 0,5-1 mM (Crawford, 1995; Trueman et al., 1996; Quesada et al., 1997).

### 1.1.2. Reducción de nitrato hasta amonio.

Las enzimas para la reducción de nitrato hasta amonio se han localizado tanto en las raíces como en las hojas de las plantas (Oaks y Hirel, 1985). La reducción de nitrato hasta amonio requiere un total de 8 electrones en dos etapas consecutivas de reducción, catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR).

#### 1.1.2.1. Nitrato reductasa.

La NR, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito, está localizada en el citosol de las células del mesófilo de las hojas y de las células corticales y epidérmicas de las raíces (Vaughn y Campbell, 1988; Fedorova et al., 1994). La reacción de la NR requiere dos electrones, suministrados por piridín nucleótidos reducidos. Aunque en plantas la isoforma más común de NR es la dependiente de NADH (NADH-NR: E.C. 1.6.6.1), en algunas plantas

también se han identificado isoformas biespecíficas, que usa indistintamente NADH o NADPH (NAD(P)H-NR: E.C. 1.6.6.2) (Campbell y Kinghorn, 1990). En hojas, se ha propuesto que la fuente mayoritaria del NADH para la reducción del nitrato a nitrito en el citosol procede del NADPH generado por el fotosistema II en el cloroplasto, que es exportado al citosol como NADH por la lanzadera malato/oxalacetato entre ambos compartimentos celulares (House y Anderson, 1980). Por otra parte, cuando la reducción de nitrato tiene lugar en las raíces, el poder reductor necesario procede del ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato (Oaks y Hirel, 1985).

La NR en plantas superiores es un homodímero de 100 a 115 kDa por subunidad (Campbell y Kinghorn, 1990; Kleinhofs y Warner, 1990; Caboche y Rouzé, 1990; Campbell, 1996). En cada una de las subunidades se unen tres grupos prostéticos: FAD, hemo, y un cofactor de molibdopterina (MoCo), en relación 1:1:1. Además de la actividad fisiológica NAD(P)H-nitrato reductasa, la enzima puede catalizar *in vitro* las actividades parciales NAD(P)H-ferricianuro reductasa o NAD(P)H-citocromo c reductasa (actividad diaforasa) y MV-nitrato reductasa (actividad terminal). Durante la reducción del nitrato, los electrones fluyen desde el NAD(P)H hasta el nitrato siendo transportados sucesivamente por estos tres centros redox. Los distintos grupos prostéticos se localizan en dominios funcionales característicos en la NR, y que han sido definidos en base a homologías de secuencias con distintas proteínas de mamíferos, plantas y levaduras, análogas en grupos prostéticos, así como en base a análisis de degradación proteolítica de la NR, que rinde fragmentos de la enzima con las actividades catalíticas parciales (Solomonson y Barber, 1990). Dichos dominios pueden confirmarse también mediante estudios con mutantes de *N. plumbaginifolia* afectados en las actividades parciales de la NR, los cuales han demostrado además que la NR muestra complementación intragénica, de modo que durante la reducción de nitrato los electrones pueden fluir a través de los centros redox de una subunidad a otra (Pelsy y Gonneau, 1991). El análisis de secuencia de aproximadamente 20 clones disponibles de los genes de NR eucarióticas, ha mostrado una alta conservación de la secuencia dentro de los dominios del FAD, hemo y MoCo entre las diferentes NRs. Separando estos dominios se encuentran secuencias de menor grado de conservación, que se denominan bisagras, y son los sitios susceptibles de degradación proteolítica de las NRs. Por otro lado, próxima al extremo N-terminal de la proteína, se encuentra una secuencia de longitud variable y poco conservada, rica en aminoácidos de carácter ácido (Campbell, 1996). Recientemente se ha demostrado el papel de esta secuencia en la regulación post-transcripcional de la NR (Nussaume et al., 1995), a la que se hará mención posteriormente.

El análisis genético de la NR se ha desarrollado gracias a la obtención de mutantes, la mayoría de los cuales están afectados en el gen estructural, y ha revelado que en la mayoría de las plantas la NR está codificada por más de un gen (Kleinhofs et al., 1989; Cheng et al., 1988; Crawford y Arst, 1993; Caboche y Rouzé, 1990).

Un aspecto interesante e inesperado se ha derivado de los estudios de la NR a nivel genético y molecular, y es que los niveles de NR parecen estar en exceso sobre los que se requieren para el crecimiento vegetativo normal de las plantas. Así, los mutantes de cebada en el gen *nar 1*, o los de *A. thaliana* en el gen *nia 2* de, que carecen del 90% de la actividad NR en las hojas, pero que crecen como las plantas del tipo silvestre en presencia de nitrato (Kleinhofs y Warner, 1990; Wilkinson y Crawford, 1991), hecho que se ha confirmado con plantas mutantes de *N. plumbaginifolia*, sin actividad NR, que pueden ser complementadas con la expresión de un transgén de NR, que sólo se expresa a un 10% del nivel del tipo silvestre (Vincentz y Caboche, 1991; Dorbe et al., 1992).

#### 1.1.2.2. Nitrito reductasa.

En organismos fotosintéticos, una vez que el nitrato es reducido a nitrito (Fig. 2), éste es reducido hasta amonio mediante la reacción catalizada por la Fd-NiR (E.C. 1.7.7.1), enzima codificada por un gen nuclear y localizada en el estroma de los cloroplastos en hojas y de los plastos en raíces (Gupta y Beevers, 1987). La reducción de nitrito a amonio requiere 6 electrones, que son suministrados por la ferredoxina reducida a partir del transporte no cíclico fotosintético de electrones. En raíces, isoformas específicas de Fd-NADP<sup>+</sup> reductasa reducen a isoformas también específicas de ferredoxina a partir del NADPH generado en el ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato, suministrando el poder reductor para la reacción de la Fd-NiR (Suzuki et al., 1985; Bowsher et al., 1989).

La Fd-NiR de plantas superiores es un monómero de alrededor de 63 kDa, y contiene 2 centros redox como grupos prostéticos: un centro sirohemo, y un centro 4Fe-4S. Se piensa que estos dos centros se localizan en la mitad C-terminal de la proteína, en base a la comparación de secuencias con otras proteínas, mientras que el dominio de interacción con la ferredoxina estaría en la región N-terminal (Campbell y Kinghorn, 1990).

En el grupo de las plantas superiores el gen de la Fd-NiR ha sido clonado a partir de distintas fuentes (Daniel-Vedele y Caboche, 1996). La comparación de las secuencias muestra una alta homología entre los distintos clones de NiR (66-79%).

### 1.1.3. Asimilación de amonio hasta aminoácidos.

El amonio es incorporado a esqueletos carbonados para dar lugar a aminoácidos gracias a la acción consecutiva de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) (Lea y Miflin, 1974). Ambas enzimas trabajan de forma combinada en lo que se ha denominado ciclo GS-GOGAT (Fig. 2). El amonio es primeramente incorporado sobre glutamato para rendir glutamina, mediante la reacción acoplada a la hidrólisis de ATP catalizada por la GS. Posteriormente, el grupo amida de la glutamina es transferido al 2-oxoglutarato, mediante la transaminación reductiva catalizada por la GOGAT, quedando incorporado en la posición 2-amino del glutamato. Una de las dos moléculas de glutamato formado puede funcionar como aceptor de amonio para un nuevo ciclo, mientras que la otra constituye el producto final del ciclo GS-GOGAT, y puede funcionar como sustrato de enzimas de transaminación.

#### 1.1.3.1. Glutamina sintetasa.

Esta enzima (E.C. 6.3.1.2) en plantas superiores es una proteína octamérica de masa molecular de 350 a 400 kDa (Stewart et al., 1980), compuesta de subunidades carentes de grupos prostéticos, de masas comprendidos entre 38 y 45 kDa. Diferentes isoformas de GS se han identificado en hojas, raíces y nódulos de las raíces de leguminosas. En hojas se han aislado dos isoenzimas de GS: GS<sub>1</sub>, localizada en el citosol, y GS<sub>2</sub>, localizada en los cloroplastos, variando la proporción de ambas isoenzimas de unas especies a otras (McNally et al., 1983). Dicha proporción también puede alterarse dependiendo del estado de desarrollo (Tobin et al., 1985; Yamaya et al., 1992) y de factores ambientales como la luz (McNally y Hirel, 1983; Edwards y Coruzzi, 1989).

En raíces se ha identificado una isoforma distinta, GS<sub>r</sub>, muy similar a la isoforma citosólica de hojas (Hirel y Gadal, 1980), y, en algunas plantas también la isoforma GS<sub>2</sub>, localizada en los plastos (Sechley et al., 1992; Woodall, 1994). Por otra parte, la GS es expresada a altos niveles en nódulos de leguminosas. En el caso de *Phaseolus vulgaris*, la GS de nódulos puede ser separada en dos distintas isoenzimas, denominadas GS<sub>n1</sub> y GS<sub>n2</sub> (Lara et al., 1983). Todas estas isoformas de GS en raíces y nódulos son de localización citosólica.

La base molecular que determina la presencia de distintas isoformas de GS ha sido establecida a partir de la clonación de una familia de genes que codifican para distintas subunidades (Forde y Cullimore, 1989; McGrath y Coruzzi, 1991; Sakakibara et al., 1992a; Peterman y Goodman, 1991; Sakamoto et al., 1989). Los distintos genes presentan una homología del 86-



91%, lo cual ha sugerido que esta familia de genes haya derivado de un gen ancestral común. Las distintas isoenzimas de GS se derivan del ensamblaje de distintos tipos de subunidades para formar el complejo octamérico: en *P. vulgaris*, la isoenzima citosólica de hojas y de raíces (GS<sub>1</sub> y GS<sub>r</sub>) contiene subunidades de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ . La isoenzima GS<sub>2</sub> está formada únicamente por subunidades de tipo  $\delta$ . En las isoenzimas de GS de nódulos se ensamblan únicamente subunidades de tipo  $\beta$  (GS<sub>m2</sub>) ó de los tipos  $\beta$  y  $\gamma$  (GS<sub>n1</sub>) (Forde y Cullimore, 1989).

### 1.1.3.2. Glutamato sintasa.

En plantas superiores existen dos proteínas antigénicamente distintas con actividad glutamato sintasa: una de ellas es dependiente de NADH como donador de electrones, NADH-GOGAT (E.C. 1.4.1.14) y otra que usa específicamente ferredoxina reducida, Fd-GOGAT (E.C. 1.4.7.1). En general, la Fd-GOGAT, de localización cloroplástica, es la forma mayoritaria en hojas, donde también se ha comprobado la presencia de NADH-GOGAT. La NADH-GOGAT está localizada en los plastos, pero donde es más abundante es en los nódulos de raíces de leguminosas (Sechley et al., 1992). En los plastos de raíces también se ha comprobado la presencia de Fd-GOGAT, que en el caso de arroz, parece ser una proteína relacionada con la Fd-GOGAT de hojas, pero no idéntica (Suzuki et al., 1982).

La Fd-GOGAT de distintos organismos fotosintéticos ha sido bien caracterizada a nivel bioquímico (Lea et al., 1990). En plantas superiores, la Fd-GOGAT consiste en un monómero de masa molecular comprendida entre 130 y 180 kDa. La enzima ha sido purificada de varias fuentes, y contiene como grupos prostéticos flavina y un centro sulfoférico. Aunque inicialmente en la enzima de espinaca, al igual que en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Márquez et al., 1986), se describió la presencia de FAD y FMN como flavinas, en un trabajo reciente se ha concluido que la enzima sólo presenta FMN (Hirasawa et al., 1996). El centro sulfoférico es del tipo 3Fe-4S (Knaff et al., 1991).

En la presente década, la obtención sucesiva de clones totales o parciales de los genes que codifican para la Fd-GOGAT en maíz (Sakakibara et al., 1991), tabaco (Zehnacker et al., 1992), cebada (Avila et al., 1993), espinaca (Nalbantoglu et al., 1994), pino (García-Gutiérrez et al., 1995), la cianobacteria *Synechocystis* (Navarro et al., 1995) y recientemente *A. thaliana* (Suzuki y Rothstein, 1997) han permitido el avance en los estudios de biología molecular de esta enzima. La comparación de las secuencias de los distintos clones ha revelado una alta homología entre las secuencias de

aminoácidos de las Fd-GOGATs, del orden del 85%. Las secuencias de las Fd-GOGAT muestran una homología menor (alrededor del 43%), con uno de los genes responsables de la NADPH-GOGAT de *Echerichia coli* y con la región equivalente del gen para la NADH-GOGAT de nódulos de alfalfa. En las secuencias de los clones de Fd-GOGAT se han identificado las regiones implicadas en la unión de los grupos prostéticos, FMN y centro sulfoférico, en base a la homología con el dominio de unión del FMN en el flavocitocromo b<sub>2</sub> de levadura, y la presencia de 4 residuos de cisteína conservados que podrían participar en la unión del centro sulfoférico (Sakakibara et al., 1991; Zehnacker et al., 1992; Nalbantoglu et al., 1994; García-Gutiérrez et al., 1995; Navarro et al., 1995). Ambas regiones se localizan en la mitad C-terminal de la proteína. En el dominio N-terminal se han identificado secuencias conservadas entre muy distintas glutamina-amidotransferasas del tipo *pur-F*, que se han interpretado como posibles secuencias implicadas en la interacción de la glutamina (Avila et al., 1993; Nalbantoglu et al., 1994).

El número de genes de la Fd-GOGAT por genoma varía de unas especies de plantas a otras. En cebada, los niveles de actividad Fd-GOGAT son reducidos hasta el 6% de los del tipo silvestre tanto en hojas como en raíces de los mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT, indicando que las enzimas de ambos tejidos están codificadas por un único gen (Kendall et al., 1986; Avila et al., 1993). En maíz, espinaca y pino se ha comprobado asimismo la presencia de una sola copia del gen para la Fd-GOGAT por genoma (Sakakibara et al., 1991; Nalbantoglu et al., 1994; García-Gutiérrez et al., 1995). Sin embargo, en arroz (Suzuki et al., 1982) se había sugerido la existencia de distintas isoformas en hojas y raíces, y en *A. thaliana* recientemente se ha comprobado la existencia de dos genes, uno (*glu1*) se expresa predominantemente en hojas, y otro, (*glu2*) que lo hace en raíces (Lam et al., 1995; Oliveira et al., 1997). Resulta también muy interesante que en la cianobacteria *Synechocystis* se hayan identificado dos genes para Fd-GOGAT, *gltB* y *gltS*, ambos similares a la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de bacterias, siendo uno de ellos más parecido a la NADH-GOGAT que a la Fd-GOGAT de plantas. Sin embargo, los mutantes en que alguno de los genes anteriores son mutagenizados mediante inserciones, retienen niveles sustanciales de actividad Fd-GOGAT, mientras que no ha podido detectarse actividad dependiente de piridin nucleótidos en este organismo. Los autores concluyen que ambos genes codifican para Fd-GOGAT (Navarro et al., 1995).

En general, la información sobre la NADH-GOGAT es más limitada en comparación con la Fd-GOGAT. La proteína es un monómero de tamaño molecular comprendido entre 158 y 240 kDa (Lea et al., 1992), y contiene flavina y un centro sulfoférico como grupos prostéticos. El gen para NADH-

GOGAT ha sido clonado a partir de nódulos de alfalfa, y recientemente a partir de *A. thaliana*. En la secuencia de estos clones se han identificado secuencialmente dos regiones de alta homología con los genes para las subunidades grande y pequeña de la NADPH-GOGAT de *E. coli* respectivamente. En la región C-terminal de las secuencias se ha localizado una zona que podría estar implicada en la unión del NADH, que está presente también en la subunidad pequeña de la NADPH-GOGAT bacteriana (Gregerson et al., 1993; Lam et al., 1996). En alfalfa, los anticuerpos obtenidos frente a la enzima de nódulos no reaccionan con la NADH-GOGAT de hojas o de raíces, sugiriendo la presencia de distintas isoenzimas (Anderson et al., 1989), aspecto también confirmado en *P. vulgaris* (Cheng y Cullimore, 1988).

## 1.2. Asimilación de amonio fotorrespiratorio.

Además del amonio procedente de la asimilación primaria, existen otros procesos que también pueden generar amonio a nivel intracelular. Uno de estos procesos es la fotorrespiración. En plantas de metabolismo fotosintético  $C_3$  se ha estimado que el flujo de nitrógeno a través de la ruta fotorrespiratoria puede exceder en 10 veces la tasa de asimilación primaria (Keys et al., 1978). La fotorrespiración es iniciada por la actividad oxigenasa de la Rubisco, que supone la desviación de una porción de la ribulosa 1,5-bifosfato fuera del ciclo de Calvin y su conversión a una molécula de fosfoglicolato y otra de fosfoglicerato. Tras una serie de reacciones que tienen lugar en secuencia en el cloroplasto y el peroxisoma y en la mitocondria, dos moléculas de fosfoglicolato son convertidas en una molécula de serina, liberándose  $CO_2$  y amonio. Posteriormente, mediante reacciones consecutivas en el peroxisoma y en el cloroplasto la serina es convertida en fosfoglicerato que puede reintegrarse en el ciclo de Calvin (Fig. 3), con lo que, como consecuencia de este flujo, la célula recupera el 75% del carbono que se desvió por esta vía (Sechley et al., 1992). Por su parte, el amonio generado durante la decarboxilación de la glicina debe ser reasimilado para evitar la pérdida de nitrógeno. La implicación inequívoca del ciclo  $GS_2$ /Fd-GOGAT cloroplástico en la reasimilación del amonio fotorrespiratorio ha sido definitivamente establecida con la obtención de mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT y  $GS_2$  (Lea y Forde, 1994).

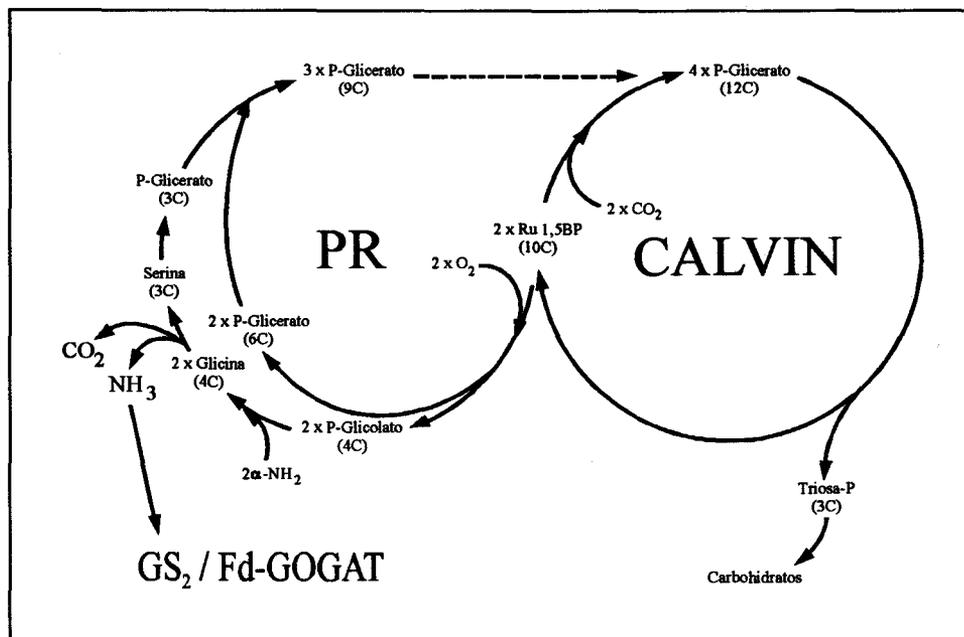


Fig. 3. Integración de los ciclos de reducción de carbono (CALVIN) y de fotorrespiración (PR). El esquema muestra sólo la estequiometría en la porción referida al ciclo de carbono fotorrespiratorio.

### 1.3. Asimilación de amonio derivado del reciclaje de nitrógeno.

En las plantas puede también generarse amonio como producto del catabolismo de proteínas, la desaminación de aminoácidos y en determinadas reacciones biosintéticas, como las que implican la síntesis de metionina, isoleucina o lignina. Para una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno, el amonio derivado de estos procesos es reasimilado (Lam *et al.*, 1996).

Existen dos momentos en que el reciclaje de nitrógeno en las plantas es de mayor intensidad, que son la germinación y la senescencia. Durante la germinación, las proteínas de reserva de las semillas son degradadas y el nitrógeno es movilizado como glutamina hacia la plántula en desarrollo. Por otra parte, durante la senescencia de las hojas, proceso que comprende la etapa final del desarrollo y en el que se suceden una serie de sucesos bioquímicos y fisiológicos que responden a un programa genético (Smart, 1994), las proteínas y otros compuestos nitrogenados, como la clorofila, son degradados, generando amonio que es reciclado y asimilado como glutamina y asparraguina, que son los compuestos de nitrógeno reducido que comunmente se transportan en las plantas hacia distintos sumideros metabólicos, como las hojas jóvenes, los frutos en desarrollo o el sistema radicular (Simpson y Dalling, 1981; Kamachi *et al.*, 1991; Sechley *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1997).

Tanto durante la germinación como la senescencia, sin embargo, también es requerida la síntesis de determinadas proteínas (Kawakami y

Watanabe, 1988a y b). Previo al inicio de esta Tesis se conocía muy poco sobre el papel de las distintas isoformas de GS y GOGAT en relación con estos procesos (Forde et al., 1989). Paralelamente con nuestro trabajo se ha ido describiendo la expresión diferencial de determinadas isoformas de GS y GOGAT, que indican un papel para éstas en dichos procesos.

## **2. LA REGULACION DE LA ASIMILACION DE NITROGENO.**

La regulación de la asimilación de nitrógeno ha sido extensamente estudiada en hongos, algas, bacterias y plantas superiores. Sobre una base bioquímica y fisiológica, los estudios de regulación se han desarrollado posteriormente con la obtención de clones y mutantes para las distintas enzimas, y con los estudios de expresión de los genes que codifican para éstas en plantas transgénicas.

Dos hechos de la asimilación de nitrógeno se pueden destacar como generalidades: en primer lugar la existencia de múltiples isoformas de las distintas enzimas implicadas en el proceso (Crawford, y Arst, 1993; Lam et al., 1996). Por otra parte, podría decirse que en cuanto a regulación hay diferencias cualitativas muy importantes entre la primera fase de reducción de nitrato hasta amonio, catalizada por las enzimas NR y NiR, que constituye un sistema inducible/reprimible, que responde con presencia/ausencia de las enzimas, y la asimilación de amonio, con niveles enzimáticos constitutivos pero que oscilan en función de distintas condiciones y de las isoenzimas e isoformas particulares.

En los apartados siguientes resumimos los aspectos más relevantes de la regulación de la asimilación de nitrato, centrándonos fundamentalmente en la regulación de la NR y de la Fd-GOGAT, aspectos claves en los objetivos planteados en esta Tesis.

### **2.1. Regulación de la Nitrato reductasa.**

La regulación de la asimilación de nitrato ha sido intensivamente estudiada debido al papel fundamental de éste en la nutrición de las plantas. La NR, primera enzima de la ruta de asimilación de nitrato, y etapa limitante del proceso (Guerrero et al., 1981), es controlada por una red compleja de factores externos e internos, que ejercen su efecto regulador bien modificando la transcripción del gen (regulación transcripcional) o bien alterando los niveles de enzima así como su estado de actividad (regulación post-transcripcional y post-traducciona). Este sistema complejo de regulación sirve para integrar la asimilación de nitrato, que requiere poder reductor, energía y compuestos reducidos de carbono, con la fotosíntesis y el metabolismo del carbono.

La obtención de clones para NR de distintas fuentes, y posteriormente la expresión de los genes de NR en plantas transgénicas bajo promotores constitutivos, o de genes marcadores bajo los promotores de NRs han supuesto un avance importante para establecer los niveles a los que distintas señales controlan la expresión de la NR. Así, la NR es regulada a nivel transcripcional, siendo inducible por nitrato y luz (bien implicando el fitocromo, o de una manera indirecta a través de compuestos de carbono reducido), y experimenta retrocontrol por compuestos de nitrógeno reducidos, si bien en plantas no existe la represión por amonio característica de procariotas y eucariotas inferiores (algas y hongos) (Crawford, y Arst, 1993). También se conoce la influencia de los ritmos endógenos circadianos, factores plásticos y hormonas (Crawford, 1995; Daniel-Vedele y Caboche, 1996).

Junto a la regulación transcripcional, existen evidencias del control de la expresión de la NR a nivel post-transcripcional y post-traducciona. El interés de la regulación post-transcripcional se ha hecho patente a partir de los datos con plantas transgénicas que expresan el gen de la NR bajo promotores constitutivos. En estas plantas se detectan situaciones en que los niveles de mRNA no se ven alterados, pero la proteína y la actividad enzimática disminuyen (Daniel-Vedele y Caboche, 1996).

Por otra parte, diferentes mecanismos de control de la actividad han sido descritos en los diferentes organismos. El mecanismo de interconversión redox ha sido extensamente estudiado en algas verdes, donde se ha propuesto la existencia de la enzima en dos estados interconvertibles, uno oxidado (enzima activa) y otro reducido (enzima inactiva) (revisado por García Guerrero et al., 1981; Solomonson y Barber, 1990). *In vitro*, la enzima es inactivada por NADH y bajas concentraciones de cianuro u  $O_2$  en ausencia de nitrato (Solomonson y Vennesland, 1972; de la Rosa, 1983), siendo reactivada por ferricianuro y luz azul (Solomonson, 1974; Maldonado y Aparicio, 1987). La luz y el  $O_2$ , en ausencia de nitrato y  $CO_2$ , son requeridos para la conversión a la forma inactiva de la enzima *in vivo* (Pistorius et al., 1976). Aunque en plantas superiores se ha descrito un sistema similar de interconversión redox, no se ha conseguido purificar un complejo inactivo NR-cianuro como en el caso de la enzima de algas (Lorimer et al., 1974).

Otros mecanismos de inactivación de la NR en plantas superiores han sido referidos en la literatura. Una serie de endopeptidasas más o menos específicas que afectan la actividad de la NR han sido referidas (Wallace y Oaks, 1986; Batt y Wallace, 1989), así como otros factores inactivantes de la NR, proteínas que parecen no actuar mediante proteólisis limitada, sino por unión a la NR, llevando a una inactivación reversible o irreversible (Yoshimura et al., 1992).

En los últimos años, un mecanismo de modificación covalente de la NR mediado por fosforilación reversible ha constituido un área de intensa investigación en plantas superiores, y ha sido estudiado principalmente en la NR de hojas de espinaca, aunque dicho mecanismo ha sido descrito que opera sobre la NR de otras fuentes (de Cires *et al.*, 1993a y b; Lillo, 1993; Huber *et al.*, 1994a; LaBrie y Crawford, 1994; Kojima *et al.*, 1994; Bergareche *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995; Nussaume *et al.*, 1995). Este mecanismo puede explicar los cambios rápidos de actividad NR que tienen lugar en tan sólo minutos durante las transiciones de luz a oscuridad, y en respuesta a la disponibilidad de carbono (CO<sub>2</sub>, carbono reducido) así como en condiciones de cierre estomático como consecuencia del estrés hídrico (Huber *et al.*, 1994a y b; MacKintosh, 1997). Por otra parte, un mecanismo similar parece ser responsable de la inactivación de la NR en raíces de guisante y cebada en respuesta a la hiperaerobiosis (Glaab y Kaiser, 1993; Botrel *et al.*, 1996).

El estado de activación de la NR *in vivo* sólo puede ser detectado *in vitro* en presencia de cationes Mg<sup>2+</sup> en los ensayos, de manera que los ensayos en ausencia de Mg<sup>2+</sup> reflejan el nivel máximo de actividad, mientras que en presencia del catión, se detectan las alteraciones de actividad relacionadas con el mecanismo de activación/inactivación al observarse menor nivel de actividad (enzima inactiva) en oscuridad, bajos niveles de CO<sub>2</sub>, déficit hídrico y hiperaerobiosis (Huber *et al.*, 1994b; MacKintosh, 1997).

Una serie de evidencias han puesto de manifiesto que este mecanismo de inactivación/activación está mediado por fosforilación/ defosforilación: la NR en extractos desalados de hojas iluminadas es inhibida en presencia de cationes Mg<sup>2+</sup> por diversos nucleósido trifosfatos, y por una proteína quinasa que puede ser separada de la NR mediante cromatografía. Además, la enzima extraída de hojas en oscuridad puede ser reactivada por fosfatasas endógenas. Por otra parte, la NR es fosforilada *in vivo* al suministrar a las hojas <sup>32</sup>P-Pi, observándose una correlación inversa entre el estado de fosforilación y el estado de activación (Huber *et al.*, 1994b). Otras evidencias de la operatividad de dicho mecanismo *in vivo* son el hecho de que la reactivación de la NR durante las transiciones de oscuridad a luz es bloqueada al suministrar a las hojas inhibidores de fosfatasas, y el que en hojas en oscuridad en presencia de manosa (secuestrador de fosfato) se observe la activación de la enzima (MacKintosh, 1992; Huber *et al.*, 1992; Glaab y Kaiser, 1995). Sin embargo, la fosforilación de la NR por sí sola no conlleva la inactivación de la enzima, sino que ésta sólo se produce por la unión a la NR fosforilada de la proteína inhibidora NIP (Nitrate reductase Inhibitor Protein) en presencia de cationes Ca<sup>2+</sup> ó Mg<sup>2+</sup> (MacKintosh, 1997). La Fig. 4 recoge el modelo propuesto de regulación de la NR de hojas de espinaca por el mecanismo descrito.

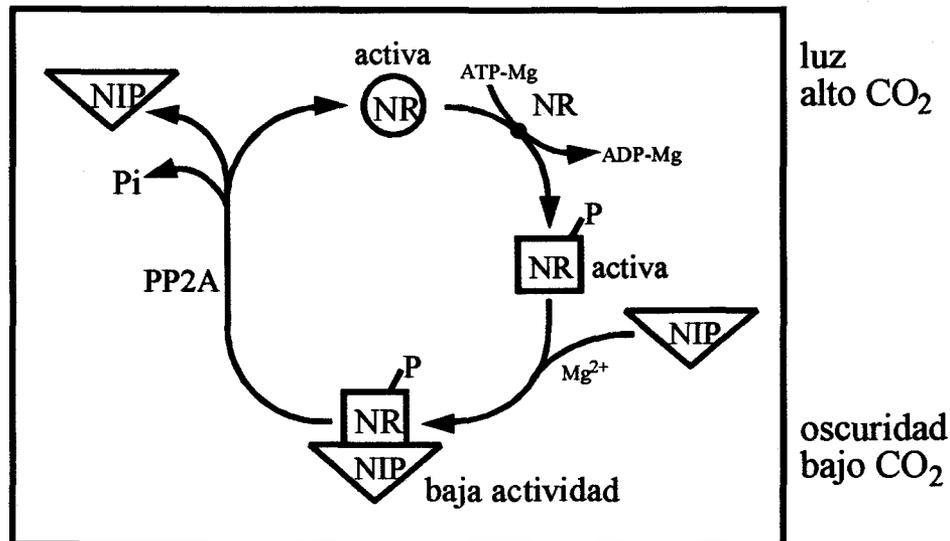


Fig. 4. Modelo del mecanismo de inactivación reversible de la NR de hojas de espinaca por fosforilación/defosforilación propuesto por MacKintosh et al. (1995).

Recientemente se ha identificado la proteína NIP como una mezcla de proteínas del grupo 14-3-3, que están implicadas en las interacciones proteína-proteína y en sucesos relacionados con quinasas en rutas de transducción de señales (Bachmann et al., 1996; Moorhead et al., 1996). Aunque diferentes residuos de la NR de espinaca son fosforilados *in vivo*, se ha identificado el residuo de serina 543, localizado en la región bisagra que separa el dominio de hemo y el dominio del MoCo, como el sitio clave implicado en la regulación de la actividad enzimática (MacKintosh, 1997). En extractos crudos de espinaca se han separado dos picos con actividad NR quinasa mediante cromatografía de intercambio aniónico, uno de los cuales también muestra actividad quinasa sobre la SPS (sacarosa fosfato sintasa) (Mackintosh, 1997). Una de las quinasas es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la otra es regulada por  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ , lo cual podría sugerir que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol puedan actuar como señal reguladora (Bachmann et al., 1995).

En el citosol otras enzimas, en este caso del metabolismo del carbono, están reguladas por fosforilación/defosforilación: SPS y PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa). El estado de activación de la NR, SPS y PEPC parece cambiar de manera coordinada en respuesta a determinadas señales, aunque no a otras. Se piensa que el resultado de esta regulación podría ser la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno (Champigny, 1995; MacKintosh, 1997).

## 2.2. Regulación de la Fd-GOGAT.

La asimilación del amonio hasta aminoácidos, como se indicó anteriormente, tiene lugar a través del ciclo GS/GOGAT. En las células vegetales existen distintas isoenzimas e isoformas de cada una de estas enzimas. La expresión de cada una de estas isoformas está diferencialmente regulada en respuesta a estímulos ambientales como la luz, el estado de desarrollo, el tipo de órgano y el tipo celular (Sechley et al., 1992; Lam et al., 1996; Oliveira et al., 1997).

En la mayoría de las plantas, se ha observado que la Fd-GOGAT es estimulada por luz durante la iluminación de las plantas etioladas (Walsgrove et al., 1982, Match y Takahashi, 1981) lo que parece responder a un control transcripcional (Sakakibara et al., 1992a y b; Zehnacker et al., 1992; Becker et al., 1993). En algunos casos se ha descrito la implicación del fitocromo (Hecht et al., 1988; Elmlinger y Mohr, 1991; Becker et al., 1993). En *Pinus pinaster*, sin embargo, García-Gutiérrez et al. (1995) han descrito la expresión independiente de la luz de la Fd-GOGAT, que podría estar relacionada con la provisión de glutamato para la biosíntesis de compuestos nitrogenados durante la biogénesis de los cloroplastos en oscuridad, que ocurre en pino y en otras especies de gimnospermas. A diferencia de la Fd-GOGAT, la NADH-GOGAT no parece ser estimulada por luz, sino que en algunos casos se ha descrito un descenso en los niveles de actividad tras la iluminación (Suzuki y Rothstein, 1997). La estimulación por luz de la Fd-GOGAT sugiere que la función de esta enzima esté relacionada con procesos dependientes de luz, como la fotosíntesis y la fotorrespiración (Lam et al., 1996; Oliveira et al., 1997)

Los resultados del análisis de mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT (Somerville y Ogren, 1980; Kendall et al., 1986; Blackwell et al., 1988b; Lea et al., 1992) sugieren un papel fundamental para la Fd-GOGAT en la reasimilación del amonio fotorrespiratorio, y, por otra parte, que la Fd-GOGAT puede ser dispensable para otras funciones, ya que los mutantes deficientes en esta enzima pueden crecer normalmente en condiciones no fotorrespiratorias. Los mutantes aislados en cebada deficientes en actividad GS<sub>2</sub> (Blackwell et al., 1987; Wallsgrove et al., 1987) muestran un fenotipo letal condicional similar a los deficientes en Fd-GOGAT, lo cual apoya que en los cloroplastos, el ciclo GS<sub>2</sub>/Fd-GOGAT trabaja fundamentalmente en la reasimilación del amonio generado en fotorrespiración. Otros resultados de estudios de la regulación de estas enzimas apoyan dicha función, como el hecho de que la Fd-GOGAT y la GS<sub>2</sub> sean estimuladas por luz de manera coordinada específicamente en las células de la vaina en maíz, donde opera la fotorrespiración, aunque reducida

(Sakakibara et al., 1992b). Igualmente, en *A. thaliana* se ha descrito una regulación de ambas enzimas por luz de manera coordinada (Oliveira et al., 1997). En un trabajo reciente, Migge et al. (1997) han demostrado, sin embargo, que la supresión de la fotorrespiración no tiene efecto alguno sobre los niveles de mRNA de la GS<sub>2</sub> y Fd-GOGAT en hojas de tabaco, a diferencia de lo descrito previamente (Edwards y Coruzzi, 1989). La supresión de la reducción de nitrato por el tratamiento de las plantas con tungsteno no altera tampoco la expresión de los genes de GS<sub>2</sub> y Fd-GOGAT en esta planta. Los autores proponen que la expresión estable de estos genes podría proveer un exceso de capacidad de asimilación de amonio en condiciones en que la demanda de compuestos reducidos de nitrógeno excede la tasa de asimilación primaria.

Aunque el fenotipo fotorrespiratorio condicional de los mutantes de Fd-GOGAT y GS<sub>2</sub> indican que la función principal de ambas enzimas es la asimilación del amonio fotorrespiratorio, en distintos sistemas se ha descrito la regulación de la Fd-GOGAT y la GS<sub>2</sub> por nitrógeno exógeno, no pudiendo entonces descartar la implicación de éstas en la asimilación primaria. Sin embargo, la regulación de la Fd-GOGAT por nitrógeno exógeno es un tema de controversia, hasta el punto de que en un mismo sistema se han descrito distintas respuestas de la enzima al nitrógeno exógeno (Sakakibara et al., 1992b; Redinbaugh y Campbell, 1993). También se han descrito distintas respuestas en distintos sistemas. En algunos casos se ha descrito la inducción específica de la Fd-GOGAT por nitrato, pero no por otras fuentes de nitrógeno (Watanabe et al., 1996). En otros casos, por el contrario, la Fd-GOGAT es igualmente estimulada por nitrato o amonio (Suzuki et al., 1996). Aunque algunos autores han descrito la inducción rápida, transitoria e independiente de la síntesis de proteína de la Fd-GOGAT por nitrato exógeno (Redinbaugh y Campbell, 1993; Mattana et al., 1996), otros autores son más bien partidarios de que la leve respuesta de la GS<sub>2</sub> y de la Fd-GOGAT al nitrógeno exógeno no es específica como en el caso de la NR y la NiR, y más bien parece formar parte de la respuesta general de la planta a la carencia de nitrógeno (Migge y Becker, 1996).

La coexistencia de la Fd-GOGAT y NADH-GOGAT en los plastos de raíces plantea la cuestión sobre si estas dos isoformas desarrollan funciones solapantes en dicho tejido. Suzuki y Gadal (1984) han postulado que la NADH-GOGAT podría desarrollar una función auxiliar en la asimilación de amonio, especialmente en raíces o en oscuridad. Recientemente se ha mostrado que la NADH-GOGAT está localizada en el parénquima vascular de hojas jóvenes de arroz (Hayakawa et al., 1994). Los cambios en el contenido de las dos isoenzimas de GS y de las dos GOGATs han llevado a proponer

que la NADH-GOGAT y la GS<sub>1</sub> están involucradas en la síntesis de glutamato a partir de la glutamina que es transportada desde tejidos senescentes a través del floema hasta tejidos no verdes que actúan como sumideros metabólicos en hojas de arroz (Yamaya et al., 1992; Kamachi et al., 1991; 1992).

### 3. OBJETIVOS.

Como objetivos de esta Tesis, hemos tenido la oportunidad de estudiar aspectos de regulación o expresión en relación con la NR y Fd-GOGAT.

Por un lado, hemos llevado a cabo estudios de regulación de la expresión de la Fd-GOGAT en una planta de interés agrícola como es la cebada, haciendo uso de herramientas disponibles, esto es, anticuerpos policlonales específicos obtenidos frente a la enzima purificada de hojas (Márquez et al., 1988) y un clon parcial de cDNA de la Fd-GOGAT, correspondiente al extremo N-terminal de la proteína (Avila et al., 1993), así como líneas mutantes fotorrespiratorias deficientes en la actividad Fd-GOGAT (Kendall et al., 1986). En concreto, nuestro trabajo se ha dirigido a:

- a) Estudiar a nivel de actividad enzimática, proteína y mRNA la regulación de la expresión de la Fd-GOGAT en respuesta a factores como la luz y el carbono, la disponibilidad de nitrógeno, el estado de desarrollo y la diferenciación de órganos en plantas silvestres de cebada, analizando desde una perspectiva inmunológica la posible identidad de las enzimas Fd-GOGAT de hojas y raíces.
- b) Examinar la expresión de la Fd-GOGAT a nivel de proteína y mRNA en las líneas mutantes fotorrespiratorias de cebada RPr 82/1, RPr 82/9, RPr 84/42 y RPr 84/82, todas deficientes en actividad Fd-GOGAT, con el fin de determinar las posibles lesiones que afectan a estos mutantes.

Si bien la NR ha sido más ampliamente estudiada y, como vimos anteriormente, se ha establecido que es regulada por una compleja red en respuesta a distintos factores, es todavía patente la falta de información sobre algunos aspectos relacionados con la regulación de esta enzima comparativamente en distintos sistemas. Aprovechando la financiación disponible en un proyecto de investigación de la CE, en colaboración con otros 4 grupos europeos, para trabajar con *L. japonicus*, planta recientemente propuesta como leguminosa modelo y de la que no existen publicaciones sobre la asimilación de nitrato, hemos iniciado el estudio de la expresión de la NR en esta planta. El hecho de que esta planta haya sido propuesta como

planta modelo para los estudios de bioquímica y biología molecular se basa en las siguientes propiedades: su corto periodo de generación (3 meses); alto rendimiento en la producción de semillas (alrededor de 6000 semillas por planta); es una planta autógama diploide con un pequeño tamaño de genoma (0,5 pg de DNA por genoma haploide) y, por último, constituye un sistema idóneo para la transformación con *Agrobacterium* (Handberg y Stougaard, 1992; Jiang y Gresshoff, 1997). En particular en esta Tesis hemos abordado los siguientes objetivos:

- a) El estudio de la expresión a nivel de actividad enzimática y proteína de la NR en hojas y raíces de *L. japonicus*, y el análisis de la presencia de distintos factores inactivantes. Voluntariamente se han omitido estudios a nivel de mRNA, ya que éstos eran objetivos de otros grupos colaboradores, si bien haremos referencia a los mismos cuando sea preciso.
- b) El objetivo anterior se completa comparándolo con el análisis del efecto de la expresión en hojas del transgén de NR de espinaca bajo el promotor *cab* en plantas transgénicas de *L. japonicus*.

## ***MATERIALES Y METODOS***

## 1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

### 1.1. Organismos.

Para la realización de este trabajo se usaron los siguientes organismos:

Cebada (*Hordeum vulgare* L., Poaceae): Se ha utilizado la estirpe silvestre de cebada de la variedad Maris Mink, así como las líneas mutantes fotorrespiratorias PrR 82/1, PrR 82/9, PrR 84/42 y PrR 84/82, todas deficientes en actividad Fd-GOGAT, y las líneas RPr 83/32 y RPr 84/90 deficientes en las actividades GS<sub>2</sub> y PGP, respectivamente. Las semillas del tipo silvestre así como de los mutantes fueron cedidas amablemente por el Dr. Brian G. Forde (Rothamsted Experimental Station, Harpenden, U.K.)

*Lotus japonicus* (Regel) Larsen, (Leguminosae): Las semillas de *L. japonicus* de la generación F<sub>5</sub>, al menos un 97% homocigóticas, obtenidas a partir de una línea endogámica del Ecotipo Gifu (número de acceso B-129), fueron cedidas gentilmente por el Dr. Jens Stougaard (Universidad de Aarhus, Dinamarca). Las plantas fueron posteriormente propagadas en macetas con suelo artificial (90% turba finlandesa 10% perlita v/v) como soporte para la obtención de semillas por auto-fertilización en un invernadero. Los esquejes de las plantas transgénicas de *L. japonicus* transformadas con el gen de la NR de espinaca bajo el promotor *cab* fueron amablemente cedidas por el Dr. Ian Prosser (IACR-Long Ashton, Bristol, U.K.). Estas plantas se propagaron vegetativamente a partir de los esquejes de ramas en cultivo hidropónico, ya que resultaron estériles en nuestras condiciones de cultivo.

Espinaca (*Spinacia oleracea* L., Chenopodiaceae): Las plantas de espinaca usadas en algunos experimentos fueron obtenidas frescas en el mercado.

*Chlamydomonas reinhardtii* (Clorophyta): La estirpe silvestre 21 gr de *C. reinhardtii* fue usada para la purificación de ferredoxina. Esta estirpe fue cedida amablemente por el Dr. Emilio Fernández (Universidad de Córdoba) y se mantenía en condiciones axénicas en agar con medio mínimo.

### 1.2. Condiciones de cultivo.

Cebada (*Hordeum vulgare*):

Las semillas de cebada fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito sódico al 1% (p/v) durante 20 minutos y posteriormente lavadas con abundante agua destilada, e hinchadas en agua destilada a 4°C durante aproximadamente 20 horas. Las semillas hinchadas fueron sembradas en

macetas de 1 dm<sup>3</sup> con 0,8 dm<sup>3</sup> de vermiculita como soporte, lavada con agua destilada. En cada maceta se sembraron 20 semillas. Las semillas fueron regadas con agua destilada durante los dos primeros días desde la siembra, y con solución de nutrientes a partir de entonces. La solución de nutrientes usada para el riego diario de las plantas fue la descrita previamente por Walker et al. (1987), y se preparaba diluyendo en agua destilada las soluciones concentradas de nutrientes A y B, cuya composición describimos a continuación:

200 x Solución A:	FeNa(EDTA) 10 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,8 M
200 x Solución B:	KNO <sub>3</sub> 1,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M MgSO <sub>4</sub> 0,4 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 10 mM MnCl <sub>2</sub> 2 mM ZnSO <sub>4</sub> 0,2 mM CuSO <sub>4</sub> 0,1 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0,02 mM

El pH de la solución de riego se ajustaba a un valor de alrededor de 6,5 con la adición de NaOH.

Las plantas crecieron en una cámara de cultivo a 20-25°C, bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La intensidad de luz al nivel de las plantas fue de alrededor de 200  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , dada por la combinación de tubos de 40W de luz fluorescente alternos de tipo daylight y coolwhite suplementados con 4 lámparas OSRAM dulux electronic de 20W cada una.

Los mutantes fotorrespiratorios de cebada fueron cultivados en las mismas condiciones, con la excepción de que fueron emplazados dentro de una cabina con una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> (0,7%), tal como ha sido descrito previamente (Kendall et al., 1986). El nivel de CO<sub>2</sub> se mantenía constante merced a un sistema de control por infrarrojos que administraba las tomas de CO<sub>2</sub> gaseoso. En la Fig. 5 se muestra el fenotipo de estos mutantes cuando se cultivaban en aire solo o en aire enriquecido en CO<sub>2</sub>.

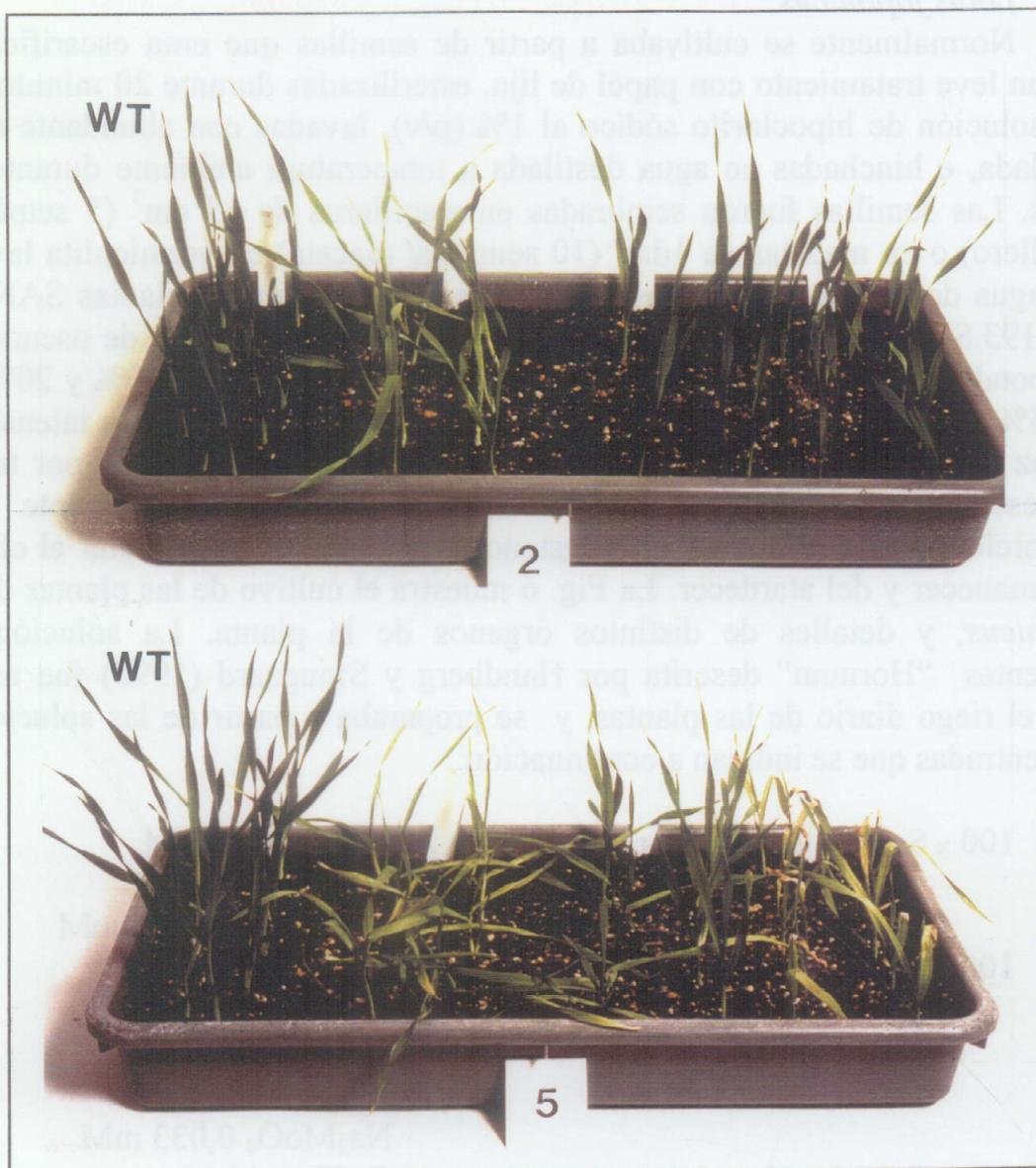


Fig. 5. Comparación del fenotipo de plantas de cebada del tipo silvestre y de líneas mutantes fotorrespiratorias deficientes en Fd-GOGAT. Las plantas se cultivaron en aire (5) o en aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  (2). Las plantas del tipo silvestre se indican como WT.

Para los experimentos con plantas etioladas, éstas fueron cultivadas en las mismas condiciones, pero manteniéndose en completa oscuridad dentro de cajas amplias de cartón localizadas en la misma cámara de cultivo.

Las plantas sometidas a carencia de nitrógeno exógeno fueron cultivadas en las mismas condiciones, salvo que en la solución de riego usada en este caso las sales de nitrato fueron sustituidas por sales de cloruro manteniendo la misma concentración de los cationes.

*Lotus japonicus*:

Normalmente se cultivaba a partir de semillas que eran escarificadas con un leve tratamiento con papel de lija, esterilizadas durante 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 1% (p/v), lavadas con abundante agua destilada, e hinchadas en agua destilada a temperatura ambiente durante 20 horas. Las semillas fueron sembradas en semilleros de 65 cm<sup>3</sup> (5 semillas/semillero) o en macetas de 1dm<sup>3</sup> (10 semillas/ maceta) en vermiculita lavada con agua destilada. Las plantas crecieron en una cámara de plantas SANYO SGR193.S26A bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad. Las condiciones de humedad relativa y temperatura fueron de 70% y 20°C, y de 65% y 18°C en las fases de luz y oscuridad respectivamente. La intensidad de luz al nivel de las plantas fue de 250 μE·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup>, suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca, suplementada con luz incandescente roja proporcionada por lámparas de tungsteno programadas para simular el efecto del amanecer y del atardecer. La Fig. 6 muestra el cultivo de las plantas de *L. japonicus*, y detalles de distintos órganos de la planta. La solución de nutrientes "Hornum" descrita por Handberg y Stougaard (1992) fue usada para el riego diario de las plantas, y se preparaba a partir de las soluciones concentradas que se indican a continuación:

100 x Solución de macronutrientes:	MgSO <sub>4</sub> 0,122 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,64 M NaFe(EDTA) 5,4 mM
100 x Solución de micronutrientes:	MnSO <sub>4</sub> 0,7 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 2 mM CuSO <sub>4</sub> 0,16 mM ZnSO <sub>4</sub> 0,14 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0,033 mM
100 x Solución de calcio:	CaCl <sub>2</sub> 1,4 M
100 x Solución de nitrato amónico:	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0,5 M
100 x Solución de nitrato potásico:	KNO <sub>3</sub> 0,3 mM

El pH de la solución de riego se llevaba hasta 6,5 con NaOH. Las plantas cultivadas en medios con amonio como única fuente de nitrógeno fueron regadas con la misma solución sustituyendo las sales de nitrato por NH<sub>4</sub>Cl y KCl a una concentración final de 4 mM y 3 mM, respectivamente. Estos medios fueron suplementados con el inhibidor de nitrificación dicianidiamida a una concentración de 90 μM.

Los esquejes de ramas de las plantas transgénicas, así como de las plantas silvestres que se usaron como control, de una longitud de 10 a 15 cm y desprovistos de las hojas inferiores, fueron cultivados en un sistema de cultivo hidropónico hasta la producción de las raíces. Los esquejes fueron sumergidos

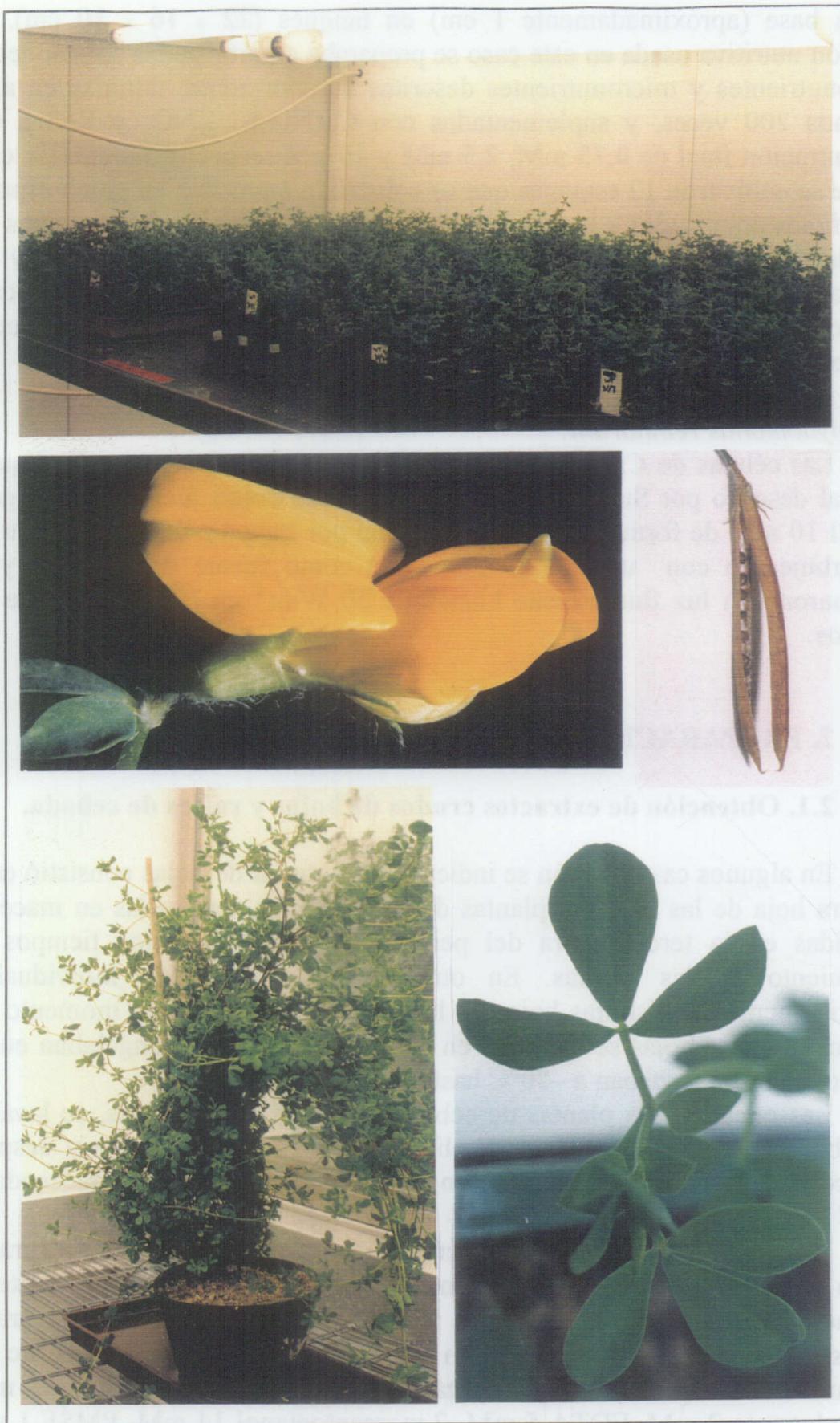


Fig. 6. Cultivo de *L. japonicus* y detalles de distintos órganos de la planta.

por la base (aproximadamente 1 cm) en tanques (22 x 16 x 10 cm). La solución nutritiva usada en este caso se preparaba a partir de las soluciones de macronutrientes y micronutrientes descritas anteriormente, diluidas en agua destilada 200 veces, y suplementadas con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$  y  $\text{KCl}$  a una concentración final de 0,75 mM, 2,5 mM y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. En cada tanque se cultivaron 12 esquejes que se colocaban envueltos en goma-espuma en orificios practicados a la tapadera del tanque. La solución de nutrientes fue aireada por la acción de una bomba similar a las usadas en acuarios y fue renovada cada 5 a 7 días. Una vez que las plantas desarrollaban raíces, al cabo de unos 10 a 14 días en las condiciones anteriores, se transferían a macetas con vermiculita como soporte, y eran regadas con la solución "Hornum".

#### *Chlamydomonas reinhardtii*:

Las células de *C. reinhardtii* se cultivaron a 25°C en el medio líquido mineral descrito por Sueoka et al. (1967), usando como fuente de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM de forma similar a la descrita por Pajuelo, 1993. Los cultivos se burbujearon con un 5% de  $\text{CO}_2$  (v/v) como fuente de carbono, y se iluminaron con luz fluorescente blanca de  $50 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  en la superficie de los cultivos.

## 2. PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS.

### 2.1. Obtención de extractos crudos de hojas y raíces de cebada.

En algunos casos, según se indicará, el material de hojas consistió en la primera hoja de las distintas plantas de 10 a 30 días, cultivadas en macetas, recogidas en la tercera hora del periodo de luz, a distintos tiempos de crecimiento de las plantas. En otros casos se recogían individual o colectivamente las distintas hojas de las plantas en un mismo momento del crecimiento. Las hojas se cortaban en trozos pequeños, se congelaban en  $\text{N}_2$  líquido, y se almacenaban a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Las raíces de las plantas de cebada se recogían completas, se lavaban con abundante agua destilada para eliminar restos de vermiculita y después eran cortadas en trozos pequeños, congeladas en  $\text{N}_2$  líquido y almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Para la obtención de extractos crudos, estos materiales fueron triturados en un mortero con la ayuda de arena de mar de grano fino. El material triturado se resuspendió a razón de 2 ml de tampón de extracción por gramo de peso fresco de material. El tampón de extracción usado fue el descrito por Márquez et al. (1988): fosfato potásico 50 mM pH7,5,  $\text{KCl}$  100 mM, 2-oxoglutarato 2 mM, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 14 mM, PMSF 1 mM (disuelto en un mínimo volumen de 2-propanol) y etilenglicol al 5% (v/v). La

suspensión resultante se centrifugó a 27.000 x g, y el sobrenadante constituyó el extracto crudo.

El tampón de extracción para la determinación de actividad NR en las hojas de cebada fue fosfato potásico 100 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, KNO<sub>3</sub> 2 mM, cisteína 10 mM, leupeptina 10 μM, FAD 10 μM.

## **2.2. Obtención de extractos crudos de hojas y raíces de *L. japonicus*.**

Las raíces de las plantas de *L. japonicus* se recogían, salvo que se indique lo contrario, en la tercera hora de la fase de luz. Las raíces completas se lavaban con abundante agua destilada, se cortaban en trozos pequeños y se congelaban en N<sub>2</sub> líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso. Las hojas de las plantas se procesaban de la misma manera. Para la obtención de los extractos crudos los materiales anteriores se trituraban en un mortero de porcelana en presencia de N<sub>2</sub> líquido. Salvo que se indique lo contrario, el material triturado de raíces se resuspendía inmediatamente después de descongelarse, a razón de 2 ml por gramo de peso fresco de material en el siguiente tampón de extracción (tampón estándar): HEPES-KOH 100 mM pH 7,5, KNO<sub>3</sub> 2 mM, cisteína 10 mM, FAD 10 μM, leupeptina 10 μM. El material triturado de hojas se resuspendió en el mismo tampón a razón de 10 ml por gramo de peso fresco de material, y en presencia de PVPP insoluble pretratada con ácido, a razón de 0,5 g por gramo de peso fresco de material. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 27.000 x g y el sobrenadante se usó como extracto crudo.

Para los estudios de inactivación de la NR de *L. japonicus* por cationes Mg<sup>2+</sup> se usaron tampones de extracción diferentes, similares a los descritos en la literatura (Huber et al., 1992; Mackintosh et al., 1995; Bachmann et al., 1995):

Tampón de extracción (-Mg<sup>2+</sup>): HEPES-KOH 100 mM pH 7,5, FAD 10 μM, BSA 3% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, EDTA 10 mM.

Tampón de extracción (+Mg<sup>2+</sup>): el mismo tampón anterior sustituyendo EDTA por MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

En estos casos, los materiales de raíces y hojas se trituraban en un mortero con N<sub>2</sub> líquido, y el material triturado se repartía a partes iguales en dos morteros para la extracción en cada uno de los tampones anteriores a razón de 5 ml por gramo de peso fresco de material.

## **2.3. Obtención de extractos crudos de hojas de espinaca.**

Las hojas de espinaca fueron trituradas en un mortero con N<sub>2</sub> líquido, extrayéndose el material triturado a razón de 2 ml del mismo tampón estándar

usado para *L. japonicus* por gramo de peso fresco de material. La suspensión anterior se centrifugó a 27.000 x g y el sobrenadante constituyó el extracto crudo.

#### 2.4. Obtención de extractos crudos de *C. reinhardtii*.

Los extractos crudos se prepararon según Galván et al. (1985). Las células de *C. reinhardtii* se recogían por centrifugación a 8.000 x g durante 10 minutos, se rompieron por el método de congelación/descongelación en N<sub>2</sub> líquido durante 2 minutos y se resuspendieron a razón de 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. Los restos celulares se separaron mediante centrifugación a 27.000 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante constituyó el extracto crudo.

En todos los casos los extractos crudos fueron preparados entre 0 y 4°C.

### 3. FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS CRUDOS.

#### 3.1. Fraccionamiento de extractos crudos mediante filtración.

Los extractos crudos de raíces y hojas de *L. japonicus* fueron fraccionados mediante filtración en una unidad AMICON (Fig. 7) a través de una membrana Diaflo PM-10 de 1,5 nm de tamaño de poro, que impide el paso de moléculas de Mr superior a 10.000. La filtración se realizó con agitación magnética suave a 4°C durante un tiempo de 2 a 3 horas, aplicando una presión gas N<sub>2</sub> de 2 Kg·cm<sup>-2</sup>. Los componentes de alto peso molecular (HLMW) del extracto se concentraron de esta manera 10 veces respecto al volumen inicial de los extractos crudos. La fracción correspondiente al filtrado (LMW) también se recogía para usarlo en los experimentos.

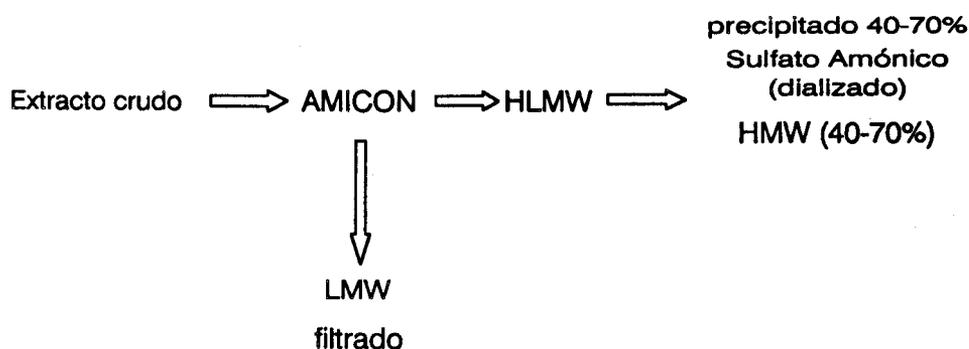


Fig. 7. Fraccionamiento de extractos crudos de raíces de *L. japonicus* en una unidad de filtración AMICON y mediante precipitación con sulfato amónico.

### **3.2. Fraccionamiento de extractos crudos mediante precipitación con sulfato amónico.**

Los extractos crudos de raíces de *L. japonicus* fueron fraccionados por precipitación con sulfato amónico añadido hasta el 40% de su saturación. A un determinado volumen de extracto crudo se le añadía 22,6 g/100 ml de la sal, manteniéndose la suspensión resultante con agitación magnética suave durante 15 minutos a 4°C. La suspensión anterior se centrifugaba durante 12 minutos a 27.000 x g, y el precipitado se redisolvió en el mismo volumen de tampón de extracción estándar que el volumen inicial de extracto crudo sometido a la precipitación. La fracción 0-40% obtenida de extractos crudos de raíces de plantas de 15 a 30 días se usó como fuente de actividad NR para numerosos experimentos (0-40% NR).

En algunos casos se usó este método para fraccionar y concentrar la proteína de extractos crudos de hojas y raíces de *L. japonicus* para el análisis mediante electroforesis e inmunodetección en filtro de la NR. En estos casos se precipitaron los extractos crudos también entre el 0 y el 40% de sulfato amónico como hemos descrito antes, y los precipitados se resuspendieron en un volumen inferior al de los extractos crudos de partida. Los extractos crudos de raíces se concentraron de esta manera 15 veces y los de hojas 6 veces respecto de los volúmenes iniciales.

La precipitación mediante sulfato amónico también se aplicó a la fracción de los componentes de alto peso molecular (HLMW) obtenidos mediante filtración en la unidad AMICON, descrito en el apartado anterior. Dicha fracción se precipitaba entre el 40 y el 70% de saturación de sulfato amónico para separar la NR, y el precipitado se resuspendía en un volumen 2,5 veces menor que el volumen de partida.

### **3.3. Diálisis.**

La separación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones de proteínas se realizó mediante uno de los dos procedimientos siguientes:

#### **3.3.1. Microdiálisis**

Se llevó a cabo en un sistema de microdiálisis de 8 pocillos de GIBCO BRL, siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada uno de los pocillos del sistema, de 1,3 cm de diámetro, se añadían 0,1 ml de la preparación a dializar, en contacto con la membrana de diálisis, de un tamaño de poro de 0,2 µm. Bajo la membrana de diálisis se pasaba tampón de diálisis (tampón estándar) a un flujo de 10 ml·h<sup>-1</sup>, generado por una bomba peristáltica. El

sistema se mantenía en hielo durante el transcurso de la diálisis, que se realizaba durante 1 hora para el volumen de muestra indicado.

### **3.3.2. Diálisis por filtración en Sephadex G-25.**

En algunas ocasiones los extractos fueron dializados mediante filtración a través de una columna ( $\varnothing$  4 mm x h 33 mm) de 2 ml de gel Sephadex G-25, equilibrada en el tampón de trabajo que se indica en cada caso. La columna se calibraba con una disolución que contenía azul dextrano a una concentración de  $2,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y  $\text{KNO}_2$   $66 \mu\text{M}$  en el tampón estándar. Se aplicaban a la columna 0,25 ml de la disolución anterior, que se dejaban eluir en la fracción 1. A continuación se aplicaba tampón, recogándose fracciones de 150  $\mu\text{l}$ . La elución del azul dextrano ocurría entre las fracciones 5 y 9, ambas incluidas (volumen de 0,75 ml), mientras que la elución de  $\text{KNO}_2$ , determinado mediante la adición de los reactivos para la determinación de nitrito descritos en el Apto. 4.2., tenía lugar entre las fracciones 10 y 17. En consecuencia, para la diálisis de extractos crudos se aplicaban 0,25 ml de los mismos a las columnas de G-25, que se lavaban posteriormente con 0,45 ml del tampón de trabajo (volumen vacío), y a continuación la proteína se eluía en un volumen de 0,75 ml del mismo tampón. El proceso se realizaba a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. El rendimiento, calculado a partir de la determinación de proteína total antes y después de la diálisis, fue del 90 al 95%. La preparación dializada, pues, experimentó una dilución de unas 3 veces respecto al extracto original.

### **3.4. Precipitación de proteínas con TCA.**

Los extractos crudos u otras preparaciones de proteína fueron desproteinizadas mediante precipitación con TCA a una concentración final del 10% (p/v) durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaba a  $27.000 \times g$  durante 10 minutos, y la fracción del sobrenadante era neutralizada con  $\text{NaOH}$  2 N.

## **4. DETERMINACIONES ANALITICAS.**

### **4.1. Determinación de proteína.**

La proteína fue determinada según el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). La mezcla de reacción de 1 ml contenía 200  $\mu\text{l}$  del reactivo comercial (BIO-RAD protein assay), 780  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 20  $\mu\text{l}$  de los extractos crudos convenientemente diluídos en su mismo tampón cuando era necesario, conteniendo entre 2 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se llevaba a

cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se medía la absorbancia a 595 nm. El calibrado del reactivo se realizaba con una solución de BSA al 0,02% (p/v). La concentración exacta de la disolución anterior era determinada a partir de la absorbancia a 279 nm, usando como coeficiente de extinción el descrito por Rideal y Roberts (1951)  $\epsilon = 0,67 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . El coeficiente de extinción determinado para el reactivo a 595 nm fue de  $35 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2. Determinación de nitrito.

El nitrito formado durante la reacción de la NR fue determinado siguiendo el método colorimétrico descrito por Snell y Snell (1949). A 0,5 ml de las mezclas de reacción, que contenían entre 3,3 y 33 nmol de  $\text{NO}_2^-$ , se añadían 0,5 ml de sulfanilamida al 1,5% (p/v) disuelta en HCl 2,5 N y 0,5 ml de N-(1-naftil)-etiléndiamina al 0,02% (p/v) preparada en agua destilada. Las muestras eran incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la formación del complejo coloreado, se centrifugaban durante 5 minutos a  $27.000 \times g$  y se medía la absorbancia a 540 nm. El coeficiente de extinción del nitrito en las condiciones del ensayo de actividad de la NR fue de  $46 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

El nitrito consumido durante la reacción de la NiR se valoró mediante el mismo método. A muestras de 3 ml que contenían entre 15 y 100 nmoles de nitrito se añadía 1 ml de cada uno de los reactivos anteriores. La reacción de desarrollo del complejo coloreado se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se medía la absorbancia a 540 nm. El coeficiente de extinción del nitrito usado en este caso fue de  $53 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3. Determinación de glutamato.

El glutamato formado tras la reacción de la Fd-GOGAT fue cuantificado por el método de Match et al. (1980), según describe Márquez (1985). A 1 ml de muestra que contenía entre 0,1 y 1  $\mu\text{moles}$  de glutamato se añadían 2 ml del reactivo de cadmio-ninhidrina, que contenía 0,4 g de ninhidrina y 1 g de acetato de cadmio disueltos en una mezcla de 80 ml de etanol absoluto, 10 ml de ácido acético y 20 ml de agua destilada. Las muestras se incubaban durante 10 minutos a  $80^\circ\text{C}$  para permitir el desarrollo del producto coloreado, y se enfriaban a continuación en hielo/agua durante 5 minutos para estabilizar el complejo formado. La absorbancia era medida en las muestras a 506 nm. El coeficiente de extinción del glutamato a esta longitud de onda fue de  $6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.4. Determinación de nitrato.

El nitrato en los extractos crudos fue determinado siguiendo el método descrito por Cataldo et al. (1975) con las siguientes modificaciones: A 50  $\mu$ l de muestra, que contenía entre 1 y 15 nmoles de nitrato, se añadieron 200  $\mu$ l de una solución de ácido salicílico al 5% (p/v) en ácido sulfúrico del 96%. Tras permitir la reacción de nitración del ácido salicílico a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadió 4,75 ml de NaOH 2N, enfriándose posteriormente durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia a 405 nm fue medida en las muestras, siendo el coeficiente de extinción a dicha longitud de onda para el complejo formado de 0,088  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.5. Determinación espectrofotométrica de NADH.

La oxidación de NADH en los ensayos de la NR fue cuantificada espectrofotométricamente registrando la disminución de absorbancia a 340 nm. La absorbancia a esta longitud de onda se medía en los ensayos de 0,5 ml en cubetas de cuarzo de 0,4 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.

#### 4.6. Cuantificación espectrofotométrica de la concentración de RNA.

La concentración de las preparaciones de RNA fue estimada de acuerdo con Sambrook et al. (1989). La concentración de RNA era calculada aplicando la siguiente expresión:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

donde la absorbancia a 260 nm era determinada a partir de muestras de 2  $\mu$ l añadidos a una cubeta con un 1 ml de agua destilada estéril.

### 5. ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

#### 5.1. Actividad Fd-glutamato sintasa.

La actividad Fd-GOGAT fue determinada según el método descrito por Márquez (1985). Los ensayos de 2 ml contenían: 0,9 ml de tampón de ensayo, de composición fosfato potásico 0,22 M, pH 7,5, glutamina 11 mM y 2-oxoglutarato 11 mM; 0,2 ml de metil viológeno 0,1 M ó 100  $\mu$ g de ferredoxina purificada de *C. reinhardtii* (Galván et al., 1985) y una cantidad de enzima comprendida entre 0,6 y 5 nkat. Para inhibir las actividades de transaminasas presentes en los extractos, se añadía en la mezcla de reacción

0,2 ml de aminooxiacetato 50 mM. La reacción era iniciada con la adición de 4 mg de ditionito sódico recientemente preparado en 0,2 ml de bicarbonato sódico 0,3 M. Las mezclas de reacción se incubaban a 30°C durante 20 minutos y la reacción era parada hirviendo los ensayos durante 2 minutos. Los blancos se realizaron de forma similar, omitiendo en éstos el metil viológeno o la ferredoxina. El exceso de reductor se oxidaba completamente mediante agitación vigorosa de los ensayos.

Previamente a la determinación del glutamato producido, las mezclas de reacción se aplicaban a columnas de 3 ml de resina de intercambio aniónico Dowex 1X8 (forma acetato), equilibrada en agua destilada, para la separación de la glutamina y el glutamato en las mismas. La glutamina era eluída en 10 ml de agua destilada y posteriormente el glutamato era eluído en 8 ml de ácido acético 2 N. Una parte alícuota de 1 ml del glutamato eluído en estas condiciones se usó para la determinación del glutamato, según se describe en el Apdo. 4.3. La actividad glutamato sintasa se expresó como nkat de glutamato formados.

## 5.2. Actividad NADH-nitrato reductasa.

Se determinó de dos diferentes maneras:

a) La actividad NR en los extractos crudos de las raíces (o los precipitados 0-40% de sulfato amónico a saturación) y hojas de *L. japonicus* obtenidos en el tampón de extracción estándar se determinó en mezclas de reacción de 0,5 ml que contenían: 25 µl de HEPES-KOH 0,5 M, pH 7,5, 50 µl de EDTA 0,1 M, 50 µl de KNO<sub>3</sub> 0,1 M, 50 µl NADH 0,3 mM y 25 µl de agua destilada. A las mezclas de reacción se añadía una cantidad de enzima comprendida entre 2 y 20 pkat, completándose el volumen hasta 0,5 ml con el tampón de extracción. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Para detener la reacción enzimática se añadieron a los ensayos 15 nmoles de PMS y 50 µmoles de acetato de zinc, disueltos en 50 µl de agua destilada. Tras incubar durante 20 minutos a 30°C para permitir la oxidación completa del NADH en exceso, y que se comprobó que puede interferir con la determinación analítica de nitrito a concentraciones por encima de 0,1 mM, se añadieron a las mezclas de reacción los reactivos para la determinación del nitrito. Los blancos de la reacción consistieron en ensayos iguales parados a tiempo cero. En algunos casos la actividad NR resultante de los experimentos se expresó como porcentaje de inactivación en las incubaciones, calculado según la expresión:

$$\text{Inactivación (\%)} = 100 - (\text{NR}_i / \text{NR}_c) \times 100$$

donde  $NR_c$  y  $NR_i$  fueron las actividades determinadas en los controles y en las muestras, respectivamente.

b) En los casos en que los materiales de hojas y raíces de *L. japonicus* fueron extraídos en los tampones ( $-Mg^{2+}$ ) y ( $+Mg^{2+}$ ) que hemos referido en el Apdo 2.2. para estudiar la inactivación de la NR por fosforilación, los ensayos de actividad NR se desarrollaron en distintos medios de ensayo. Las mezclas de reacción de 0,5 ml contenían: 0,25 ml de tampón de ensayo de composición HEPES-KOH 0,1 M, pH 7,5, FAD 20  $\mu$ M,  $KNO_3$  20 mM, NADH 0,3 mM, EDTA 10 mM (ensayo  $-Mg^{2+}$ ),  $MgCl_2$  10 mM (ensayo  $+Mg^{2+}$ ), y una cantidad apropiada de enzima, completándose el volumen hasta 0,5 ml con los respectivos tampones de extracción. Los blancos fueron realizados en ensayos iguales parados a tiempo cero. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 30°C. La reacción fue detenida de la misma manera que en el caso anterior. Los reactivos para la determinación del nitrito formado fueron añadidos a las mezclas de reacción.

En algunos casos la actividad NR se expresó como porcentaje de inhibición por  $Mg^{2+}$ , usando la expresión siguiente:

$$\% \text{ Inhibición por } Mg^{2+} = 100 - [ (+Mg^{2+}) / (-Mg^{2+}) ] \times 100$$

donde:  $(+Mg^{2+})$  = actividad en los extractos obtenidos y ensayados en presencia de EDTA.

$(-Mg^{2+})$  = actividad en los extractos obtenidos y ensayados en presencia de  $MgCl_2$ .

La actividad NR de los extractos crudos de hojas y raíces de *L. japonicus* determinada según uno u otro tipo de ensayo se expresó como  $\mu$ moles  $NO_2^- \cdot gPF^{-1} \cdot h^{-1}$ .

La actividad NR fue determinada en los extractos crudos de las hojas de cebada y de espinaca siguiendo el ensayo a), a menos que se indique lo contrario. Los ensayos se realizaron a 30°C durante 15 minutos.

Pudo comprobarse la linealidad de los ensayos con el tiempo en estas condiciones, con lo que las medidas obtenidas eran equivalentes a velocidades iniciales de reacción. Sin embargo, cuando se alteraban por alguna razón las condiciones descritas de ensayo, siempre se efectuaban cinéticas para comprobar las velocidades iniciales de reacción, pues en los extractos concentrados pudo detectarse la interferencia producida por NADH-deshidrogenasas inespecíficas que eran capaces de agotar el NADH proporcionado para la reacción de la NR, lo cual resultaba en cinéticas no lineales.

### 5.3. Actividad nitrito reductasa.

La actividad NiR en los extractos crudos de raíces de *L. japonicus* fue determinada según Pajuelo (1993) utilizando metil viológeno reducido químicamente como donador de electrones. Las mezclas de reacción contenían en un volumen de 1 ml: 0,5 ml de tampón de ensayo, de composición Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, KNO<sub>2</sub> 6 mM y metil viológeno 20 mM. A las mezclas de reacción se añadía una cantidad de enzima entre 0,4 y 2 nkat. La reacción era iniciada al reducir el metil viológeno por la adición de 15 mg de ditionito sódico recientemente disuelto en 0,1 ml de bicarbonato 0,3 M. Las mezclas de reacción se incubaban a 40°C durante 20 minutos, bloqueándose posteriormente la reacción por oxidación completa del ditionito mediante agitación vigorosa. Una parte alícuota de 30 µl de la mezcla de reacción se diluía en 3 ml de agua destilada para la determinación del nitrito consumido durante la reacción de la NiR, según se describe en el Apdo. 4.2.

La actividad NiR en los extractos crudos de hojas de espinaca y de cebada se determinaba en las mismas condiciones, salvo que la reacción se desarrollaba durante 10 minutos.

## 6. PURIFICACION DE PROTEINAS.

### 6.1. Purificación parcial de la NADH-nitrato reductasa de raíces de *L. japonicus*.

La NR fue parcialmente purificada a partir de extractos crudos de raíces siguiendo un procedimiento similar al previamente descrito por Márquez et al. (1982) para *Monoraphidium braunii*, usando una etapa de cromatografía de afinidad en Azul dextrano Sefarosa como etapa básica de purificación. 12 ml de extractos crudos de raíces obtenidos en el tampón fosfato potásico 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,15 mM y FAD 20 µM, se aplicaban a una columna de azul dextrano sefarosa (Ø1 cm x h 10 cm) a una velocidad de flujo de 12 ml·h<sup>-1</sup>. La columna se lavaba con 15 ml del mismo tampón y a la misma velocidad de flujo hasta la elución de la fracción de proteína no adsorbida. La NR se eluyó con 15 ml del tampón anterior suplementado con NADH 0,5 mM. Las fracciones que mostraban actividad fueron agrupadas.

### 6.2. Purificación de ferredoxina de *C. reinhardtii*.

La ferredoxina fue purificada a partir de células de *C. reinhardtii* según el método descrito por Galván et al. (1985). Las células se rompían por congelación/descongelación y se resuspendían en tampón fosfato potásico 50

mM pH 7,0. Los restos celulares se separaban centrifugando a  $27.000 \times g$  durante 15 minutos. Para la eliminación de pigmentos y ácidos nucleicos, los extractos eran tratados con sulfato de protamina a una concentración final de 0,16% (p/v), centrifugándose posteriormente a  $27.000 \times g$  durante 15 minutos. El sobrenadante se aplicaba a una primera cromatografía en DEAE-Sephacel, eluyéndose la ferredoxina con el tampón anterior suplementado con NaCl 0,5 M. Las fracciones que contenían ferredoxina se mezclaban, se dializaban durante 20 horas frente al tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0 y la fracción anterior se aplicaba a una segunda cromatografía en DEAE-Sephacel, eluyéndose la ferredoxina en el mismo tampón con un gradiente continuo de NaCl desde 0,2 a 0,5 M. Las fracciones que contenían ferredoxina se agrupaban y se dializaban como antes. Partes alícuotas de 1 ml de la preparación de ferredoxina purificada se almacenaban a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **7. TECNICAS ELECTROFORETICAS.**

### **7.1. Electroforesis de proteínas.**

#### **7.1.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Las electroforesis en presencia de SDS se realizaron en placa, en geles de acrilamida al 8 ó al 10% (p/v), según se analizara la Fd-GOGAT o la NR respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito previamente por Laemmli (1970), con las adaptaciones de Pajuelo (1993).

Las dimensiones de los geles eran de 14 cm de anchura, 1,5 mm de espesor, y 1,5 y 12 cm de longitud, respectivamente, para los geles empaquetador y separador.

El gel separador al 8% contenía en un volumen total de 40 ml: 10,6 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0,45% (p/v) (solución A), 8 ml de tampón Tris-HCl 1,875 M pH 8,8 (solución B), y 21 ml de agua destilada. La mezcla anterior se desgaseaba a vacío durante 15 minutos, añadiéndose posteriormente 0,2 ml de una disolución de SDS al 20% (p/v), 24  $\mu\text{l}$  de TEMED comercial y 0,2 ml de una disolución de persulfato amónico recientemente preparada al 10% (p/v). Cuando el gel separador se preparaba al 10% de acrilamida se mezclaban 13,3 ml de la solución A, 8 ml de solución B y 18,3 ml de agua destilada. El gel se aplicaba entre las placas, cubriéndose el menisco con un mínimo volumen de 2-butanol. El gel se dejaba polimerizar durante aproximadamente 45 minutos, y se eliminaba el 2-butanol lavando con abundante agua destilada.

El gel empaquetador contenía en un volumen final de 10 ml: 1,7 ml de una disolución de acilamida al 25% (p/v) y bis-acrilamida al 2,5% (p/v), 1 ml de tampón Tris-HCl 0,6 M pH 6,8, y 7,2 ml de agua destilada. Tras desgasear

durante 15 minutos a vacío, se añadía a la mezcla anterior 50  $\mu$ l de una solución de SDS al 20 % (p/v), 10  $\mu$ l de TEMED comercial, y 50  $\mu$ l de una disolución de persulfato amónico recién preparada al 10% (p/v). El gel se aplicaba entre las placas, introduciéndose rápidamente un peine para 10 muestras, y se dejaba polimerizar durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente se retiraba el peine, y se lavaban los pocillos obtenidos con abundante agua destilada para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada.

Las muestras, de un volumen no superior a 50  $\mu$ l, se mezclaban con el mismo volumen de 2 x tampón de muestras, que contenía Tri-HCl 120 mM pH 6,8, SDS al 4% (p/v), sacarosa al 20% (p/v), Azul de bromofenol al 0,05% (p/v) y 2-mercaptoetanol al 10% (p/v). Cuando el volumen de las muestras era superior a 50  $\mu$ l, éstas se mezclaban con tampón de muestras más concentrado (5 x tampón de muestras) en relación de volúmenes 4:1. Las muestras se hervían posteriormente durante 10 minutos y se aplicaban a los pocillos con la ayuda de una jeringa Hamilton.

La composición del tampón electrolito, de pH 8,3, era: 1 g de SDS, 3,03 g de Trizma base, y 14,4 g de glicina por litro.

Las electroforesis se realizaban normalmente por la noche, a una intensidad de corriente de 20 mA/placa hasta que las muestras entraban en el gel empaquetador, manteniendo posteriormente la intensidad de la corriente a 6-8 mA/placa hasta que el Azul de bromofenol alcanzaba el final de la placa.

#### 7.1.2. Electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida (4-15%).

Las electroforesis nativas se realizaron en placa, en geles con un gradiente de acrilamida entre el 4 y el 15%. Las dimensiones de los geles empaquetador y separador eran iguales a las que hemos descrito en el apartado anterior.

El gel separador se preparaba como un gradiente continuo entre las dos soluciones siguientes:

Solución de acrilamida al 4%: esta solución contenía en un volumen de 20 ml: 2,7 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0,45% (p/v) (solución A), 4 ml del tampón Tris-HCl 1,875 M pH 8,8 (solución B) y 13 ml de agua destilada. Tras desgasear la mezcla anterior a vacío durante 15 minutos, se añadían 11  $\mu$ l de TEMED comercial y 54  $\mu$ l de una disolución de persulfato amónico al 10% (p/v) recién preparada.

Solución de acrilamida al 15%: esta solución se preparaba mezclando 10 ml de la solución A, 4 ml de la solución B, 2,8 ml de glicerol y 3,2 ml de agua destilada. La mezcla anterior se desgaseaba a vacío durante 15 minutos, y posteriormente se añadían los mismos volúmenes de TEMED y de la solución de persulfato amónico que en el caso anterior.

Las soluciones anteriores se colocaban en cada uno de los tubos de un sistema formador de gradiente por vasos comunicantes con agitación, y la solución de gradiente obtenida se aplicaba a un flujo de  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  entre las placas. El menisco se cubría con una capa de 2 mm de espesor de 2-butanol. El gel se dejaba polimerizar durante aproximadamente 45 minutos, eliminándose después el alcohol con abundante agua destilada.

El gel empaquetador contenía en un volumen de 10 ml: 1,26 ml de una solución de acrilamida al 25% (p/v) y bis-acrilamida al 2,5% (p/v), 1,8 ml del tampón Tris-HCl 0,6 M pH 6,8 y 6,8 ml de agua destilada. Tras desgasear 15 minutos a vacío se añadían 6,6  $\mu\text{l}$  de TEMED comercial y 66  $\mu\text{l}$  de una disolución de persulfato amónico al 10% (p/v). El gel empaquetador se aplicaba entre las placas y se colocaba un peine para 10 muestras. Tras la polimerización del gel, el peine era retirado y los pocillos obtenidos se lavaban con abundante agua destilada.

Las muestras se mezclaban con un mismo volumen de 2 x tampón de muestras nativo, que contenía sacarosa al 20% (p/v) y Azul de bromofenol al 0,05% (p/v), y se aplicaban a los pocillos.

El tampón electrolito usado, de pH 8,3, contenía 6,06 g de Trizma base y 28,8 g de glicina por litro.

Las electroforesis nativas se realizaban a  $4^\circ\text{C}$  durante 16 a 20 horas, manteniendo la intensidad de la corriente a 8 mA/placa.

### 7.1.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

Tras las electroforesis, las proteínas en los geles de poliacrilamida se teñían durante 30 minutos con agitación suave en una disolución de Azul de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) preparada en etanol al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), y posteriormente filtrada. Tras eliminar el exceso de reactivo lavando con abundante agua destilada, los geles se desteñían en una disolución de etanol al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), renovando periódicamente esta solución hasta que el fondo de los geles se decoloraba completamente mientras las bandas de proteínas permanecían teñidas. La tinción se fijaba posteriormente sumergiendo los geles durante 15 minutos en una disolución de ácido acético al 7,5% (v/v).

### 7.1.4. Determinación de la masa molecular de proteínas por SDS-PAGE.

Para determinar la masa molecular de proteínas tras la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se cargaban en uno de los pocillos de los geles una mezcla de aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de las siguientes proteínas patrón, de tamaño molecular conocido, tratada en las mismas condiciones que las muestras: Miosina (205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), Fosforilasa b (97,4

kDa), Seroalbúmina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa) y Anhidrasa carbónica (29 kDa).

La masa molecular de las proteínas estudiadas era estimada a partir de la representación lineal directa del logaritmo decimal de las masas moleculares de las proteínas patrón frente a sus movilidades electroforéticas relativas, calculadas según la expresión siguiente:

$$R_f = \mu_p / \mu_b$$

Donde:

$\mu_p$  = movilidad absoluta de cada proteína (cm)

$\mu_b$  = movilidad absoluta del Azul de bromofenol (cm).

## 7.2. Electroforesis de RNA.

### 7.2.1. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehido.

Las electroforesis de RNA se realizaron de acuerdo con Sambrook et al. (1989). Los geles, de aproximadamente 0,6 cm de espesor y al 1,2 % (p/v) de agarosa, contenían en un volumen final de 180 ml: 2,16 g de agarosa y 135 ml de agua destilada tratada con DEPC. La mezcla anterior se esterilizaba en un autoclave, y tras enfriar hasta 60°C se añadían 36 ml de tampón 5 x FB (MOPS 100 mM pH 7,0, ácido acético 40 mM y EDTA 5 mM) y 8,8 ml de formaldehido 37% (p/v) (grado B.M.).

Las muestras contenían en un volumen final de 20  $\mu$ l: 4,5  $\mu$ l de las preparaciones de RNA, conteniendo entre 20 y 40  $\mu$ g, 3,5  $\mu$ l de formaldehido del 37%(p/v), 10  $\mu$ l de formamida (grado B.M.) y 2  $\mu$ l de tampón 5 x FB. Las muestras anteriores se desnaturalizaban durante 15 minutos a 60°C, enfriándose seguidamente en una mezcla de hielo:agua durante 5 minutos. Posteriormente se añadía a las muestras 2  $\mu$ l del tampón de muestras, que contenía glicerol al 45% (v/v), EDTA 50 mM y Azul de bromofenol al 0,25% (p/v), y se aplicaban al gel.

La electroforesis se realizaba en tampón 1 x FB (MOPS 20 mM pH 7,0, ácido acético 8 mM, EDTA 1 mM) a 25 V durante 16 a 20 horas, recirculando continuamente el tampón desde el cátodo hacia el ánodo con la ayuda de una bomba peristáltica.

### 7.2.2. Determinación del tamaño de las bandas de RNA.

Para determinar el tamaño de las bandas de RNA en estudio se cargaban en las electroforesis 0,5  $\mu$ g de una mezcla de marcadores de RNA de tamaños comprendidos entre 0,24 y 9,5 kb (GIBCO BRL). Los RNA marcadores contenían secuencias del bacteriófago  $\lambda$  (entre otras secuencias)

de modo que podían ser detectados mediante hibridación con el DNA de  $\lambda$ , digerido con HindIII, marcado radiactivamente.

El tamaño del RNA en estudio se estimaba interpolando en la recta obtenida al representar el logaritmo decimal del tamaño de los RNA marcadores frente a sus movilidades absolutas (cm) en los geles.

## **8. TECNICAS INMUNOQUIMICAS.**

### **8.1. Preparación de anticuerpos anti-péptidos de la NADH-nitrato reductasa de *L. japonicus*.**

Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo frente a tres péptidos sintéticos deducidos a partir de la secuencia del gen de NR de *L. japonicus* (trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Clarkson, número de acceso en bases de datos: X80670). Se eligieron para este propósito tres péptidos correspondientes a diferentes regiones de la proteína con distinto grado de conservación evolutiva, que mostraban buenos índices de hidrofiliidad y flexibilidad en el análisis efectuado por Neosystem S.A. (Francia). La secuencia específica de los diferentes péptidos y su localización dentro de los dominios de la NR se detalla en el Apdo. 1 de *Resultados y Discusión II*. La compañía Neosystem S.A. (Francia) llevó a cabo también la síntesis de los mismos, y la conjugación a ovoalbúmina previa al proceso de inmunización de dos conejos con cada péptido de acuerdo con un proceso estandarizado por la compañía. A los 15, 30 y 60 días después de una primera inyección se dieron a los animales tres inyecciones adicionales de recuerdo. Los sangrados se efectuaron previamente a la inmunización de los animales (suero preinmune) y a intervalos aproximados de 30 días de cada una de las inyecciones de recuerdo.

### **8.2. Inmunoinhibición de la actividad Fd-GOGAT con anticuerpos específicos.**

Partes alícuotas de los extractos crudos de hojas y raíces de cebada, con la misma actividad Fd-GOGAT, se incubaban con volúmenes crecientes (0 a 10  $\mu$ l) de la fracción de IgG anti-Fd-GOGAT, de 4 mg·ml<sup>-1</sup> obtenida por Márquez et al. (1988) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5 durante 14 horas a 4°C. Posteriormente se añadía a cada incubación (de 1 ml de volumen final) 5 mg de proteína A-Sepharosa, y la suspensión resultante se mantenía con agitación suave durante 30 minutos a 4°C. Las incubaciones eran centrifugadas a continuación durante 15 minutos a 27.000 x g, determinándose posteriormente la actividad en los sobrenadantes.

### 8.3. Inmunodetección de proteínas en filtros (“immunoblotting o western blotting”)

#### 8.3.1. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros.

Para la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (polivinildifluoruro) (Immobilon-P, Millipore) se usó un sistema de transferencia semiseca NOVABLOT 2117-250 de LKB.

Las transferencias se realizaban usando el sistema de tampones discontinuo descrito en las instrucciones del fabricante, que usaba las siguientes disoluciones en el ánodo y en el cátodo:

Solución del ánodo I: Tris-HCl 0,3 M pH 10,4

Solución del ánodo II: Tris-HCl 25 mM, pH 10,4

Solución del cátodo: ácido 6-amino-n-hexanoico 40 mM.

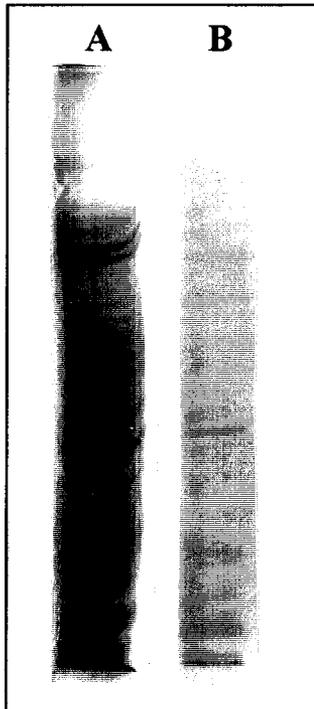
Antes de la transferencia el gel se incubaba durante 15 minutos en la solución del cátodo, y el filtro de PVDF se lavaba con metanol durante 30 segundos, se enjuagaba con abundante agua destilada, y se incubaba durante 15 minutos en la solución del ánodo II.

En contacto con el ánodo, lavado en agua destilada, se colocaban 6 trozos de papel de filtro Whatmann 1 MM, aproximadamente 1 cm mayores que el gel en cada dimensión, saturados en la solución del ánodo I. Sobre éstos se colocaban 3 filtros más saturados en la solución del ánodo II. Seguidamente se colocó el filtro de PVDF y el gel de poliacrilamida. Sobre el gel se colocaron 9 trozos de papel de filtro Whatmann 1 MM saturados en la solución del cátodo, y el cátodo saturado en agua destilada.

La transferencia se llevaba a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente a una intensidad de corriente constante, que era función de la superficie del gel según la siguiente relación:

$$I \text{ (mA)} = 0,8 \times \text{Superficie del gel (cm)}.$$

Con este sistema se conseguía una mayor eficacia en la transferencia de las proteínas en la zona de 100-200 KDa, a diferencia de otros métodos que se mostraban menos eficientes para transferir las cadenas polipeptídicas correspondientes a las enzimas investigadas en este trabajo (Fig. 8).



**Fig. 8. Eficiencia del sistema de transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros. Se separaron mediante electroforesis en SDS 500 µg de proteína total de extractos crudos de raíces de *L. japonicus*. La proteína total se analizó mediante tinción en el gel con Azul de Coomassie antes (A) o después de la transferencia (B).**

### 8.3.2. Tinción de proteínas en filtros.

Normalmente se aplicó esta tinción a la porción de los filtros correspondiente a la transferencia de las proteínas patrón.

Una vez concluida la transferencia, los filtros de PVDF se lavaban en agua para eliminar el exceso de tampón de transferencia, y se sumergían durante aproximadamente 30 minutos en una disolución que contenía Amidoblack 10 B al 0,1% (p/v), metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Los filtros se lavaban posteriormente con abundante agua destilada para retirar el exceso de reactivo.

Los filtros se desteñían en una disolución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) hasta que se decoloraba el fondo de los filtros mientras las bandas de proteínas permanecían teñidas en azul.

### 8.3.3. Inmunodetección específica de la Fd-GOGAT con anticuerpos en filtros.

Tras la transferencia, la banda de Fd-GOGAT pudo detectarse en los filtros con anticuerpos específicos anti-Fd-GOGAT obtenidos frente a la enzima purificada de hojas de cebada (Márquez et al., 1988) siguiendo el procedimiento siguiente:

Los filtros se sumergían durante al menos 10 minutos en una solución de TBS. Posteriormente los huecos libres de proteína en los filtros eran

saturados incubando los filtros durante 45 minutos en la solución de bloqueo, que contenía BSA al 3% (p/v) o leche en polvo desnatada al 5% (p/v) indistintamente, disueltas en 25 ml de TBS, manteniendo agitación suave y constante. El exceso de solución de bloqueo se eliminaba mediante lavados sucesivos de los filtros durante 30 minutos en 200 ml de la disolución de TBS.

Los filtros eran incubados posteriormente durante 90 minutos en la solución de anticuerpos primarios, que contenía 20  $\mu\text{l}$  (de una preparación de 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de IgG anti-Fd-GOGAT en 20 ml de la solución de bloqueo. El exceso de anticuerpos primarios se eliminaba lavando los filtros exhaustivamente en TBS durante 30 minutos.

Tras la incubación durante 10 minutos en 20 ml de solución de bloqueo se añadían a los filtros 20  $\mu\text{l}$  de anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo, conjugados con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim o Sigma), en 20 ml de solución de bloqueo, según las recomendaciones del fabricante. La incubación de los filtros con esta disolución se desarrollaba durante 45 minutos con agitación suave y continua, eliminando posteriormente el exceso de anticuerpos secundarios mediante lavados durante 30 minutos en TBS.

Finalmente los filtros se incubaban durante 10 minutos en una disolución de tampón Tris-HCl 0,2 M pH 9,5 y  $\text{MgCl}_2$  10 mM antes de proceder al revelado de las bandas *in situ* por la reacción de la fosfatasa alcalina. Los filtros se sumergían posteriormente en la mezcla de reacción de la fosfatasa alcalina, que contenía en un volumen de 50 ml del tampón anterior 17 mg de NBT y 7 mg de BCIP. Las bandas de proteína aparecían en pocos segundos y la reacción se bloqueaba lavando los filtros con abundante agua destilada después de 1-3 minutos.

Todo el proceso anterior se realizaba a temperatura ambiente y con agitación suave. En algunas ocasiones las etapas de bloqueo o de incubación con los anticuerpos primarios se desarrollaban durante aproximadamente 20 horas a 4°C, sin efecto alguno sobre la detección de las proteínas.

#### 8.3.4. Inmunodetección específica de la NADH-nitrato reductasa en filtros.

Puesto que se obtuvieron resultados infructuosos con los métodos de detección convencionales (peroxidasa, fosfatasa alcalina) y con el método de detección amplificado de biotina-streptavidina-biotina-fosfatasa alcalina, para la detección específica de la NR en los filtros de PVDF se usó un sistema de inmunodetección de mayor sensibilidad (ECL western blotting protocols, Amersham). El sistema utilizado se basa en la oxidación del luminol por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , catalizada por la peroxidasa en condiciones alcalinas, que es capaz de dar lugar a un producto quimioluminiscente que se puede detectar tras la exposición de los filtros a una película autorradiográfica. Para ello se siguió

un procedimiento similar al descrito en el apartado anterior con las siguientes modificaciones:

El bloqueo de los filtros se realizaba durante 16 a 20 horas a 4°C.

Como fuente de anticuerpos primarios se usaban directamente los antisueros obtenidos frente a los péptidos sintéticos deducidos a partir de la secuencia del clon de NR de *L. japonicus*, referidos anteriormente, disueltos en solución de bloqueo a una dilución 1:250.

El tiempo de incubación con los anticuerpos primarios y secundarios era de 90 y 60 minutos respectivamente.

Para eliminar el exceso de solución de bloqueo o de anticuerpos primarios o secundarios se realizaban lavados sucesivos (6 a 8) de 200 ml de una disolución TTBS durante 90 minutos.

Los anticuerpos secundarios usados en este caso eran anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa.

Tras eliminar el exceso de anticuerpos secundarios con sucesivos lavados en TTBS, los filtros se incubaban durante 10 minutos en 50 ml de TBS, antes de desarrollar la reacción de la peroxidasa.

Posteriormente los filtros se incubaban durante 2 minutos en 10 ml de una disolución recién preparada en relación 1:1 con las soluciones de detección 1 y 2 del sistema de inmunodetección ECL de Amersham, según las recomendaciones del producto. El exceso de la disolución anterior era eliminado manteniendo los filtros en posición vertical. Rápidamente los filtros se colocaban entre láminas de plástico transparentes dentro de cassettes de autorradiografía. Las autorradiografías se exponían a temperatura ambiente y las bandas de proteína podían ser visualizadas tras 5 a 20 segundos de exposición.

Todas las etapas del proceso anterior, salvo la etapa de bloqueo de los filtros, se desarrollaban a temperatura ambiente.

#### **8.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA).**

##### **8.4.1. ELISA positivo con anticuerpos anti-Fd-GOGAT.**

Para la estimación de la cantidad relativa de proteína Fd-GOGAT en extractos crudos de hojas de cebada se desarrolló un método de ELISA positivo en que el antígeno se adsorbe al pocillo.

Se usaron placas estériles de poliestireno de 96 pocillos, con fondo redondo y de aproximadamente 6,4 mm de diámetro.

Los ELISA se realizaron siguiendo el siguiente procedimiento:

Se añadían a cada pocillo 100 µl de los extractos crudos, conteniendo entre 0 y 200 ng de proteína total en tampón PBS, incubándose durante 20 horas a 4°C. Los pocillos eran posteriormente vaciados y se lavaban 3 veces

con 250  $\mu\text{l}$  de una disolución de TPBS. Posteriormente se añadían a los pocillos 200  $\mu\text{l}$  de la solución de bloqueo, que contenía BSA al 3% (p/v) en tampón PBS, para saturar los huecos libres de proteína en los pocillos. La incubación con la solución de bloqueo se llevaba a cabo durante 90 minutos, vaciándose posteriormente la placa y lavando los pocillos 3 veces con 250  $\mu\text{l}$  de la disolución TPBS. A continuación se añadían a los pocillos 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de anticuerpos primarios de 1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de IgG anti-Fd-GOGAT, (dilución 1:4.000 preparada en solución de bloqueo a partir de la preparación de 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  obtenida por Márquez et al., 1988), incubándose con el antígeno durante 2 horas. El exceso de anticuerpos primarios era eliminado mediante tres lavados consecutivos de los pocillos con 250  $\mu\text{l}$  de disolución TPBS. Posteriormente los pocillos se incubaban durante 1 hora con 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo ligados a peroxidasa, preparados a una dilución 1:6.000 en solución de bloqueo. El exceso de anticuerpos secundarios se lavaba con 5 lavados consecutivos con TPBS. La placa se vaciaba y se añadían a cada pocillo 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción de la peroxidasa recientemente preparada, que contenía ABTS al 0,05% (p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,035 % (p/v) en tampón citrato sódico 0,1 M pH 4,2. La placa se incubaba a temperatura ambiente protegida de la luz. El bloqueo de la reacción de la peroxidasa se llevaba a cabo añadiendo a cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de ácido cítrico 1 M y azida sódica al 0,02% (p/v). La absorbancia a 405 nm era medida en un lector del tipo Labsystems Multiskan (Menarini), obteniéndose una respuesta lineal de la absorbancia frente a la cantidad de proteína.

Todas las etapas, salvo la adsorción del antígeno a la fase sólida, se realizaban a temperatura ambiente.

#### 8.4.2. ELISA positivo con antiseros anti-péptidos de la NADH-nitrato reductasa..

La reacción de los antiseros con los péptidos sintéticos deducidos a partir de la secuencia de la NR de *L. japonicus* se analizó mediante un test de ELISA, similar al descrito en el apartado anterior, con las siguientes modificaciones:

Se incubaban en cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de las preparaciones de péptidos sintéticos, conteniendo entre 0 y 1  $\mu\text{g}$ , durante 12 a 16 horas a 4°C.

La incubación con la solución de bloqueo se llevaba a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para las cantidades de antígeno señaladas se probaron distintas diluciones de las preparaciones de antiseros, comprendidas entre 1:500 y 1:16.000. La incubación de los antígenos con los antiseros se desarrollaba durante 90 minutos.

El exceso de anticuerpos primarios se eliminó mediante 5 lavados consecutivos de 250 µl por pocillo de tampón TPBS.

Como anticuerpos secundarios se usaban los mismos descritos en el apartado anterior y a la misma dilución en la solución de bloqueo. La incubación con estos anticuerpos también se llevaba a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpos secundarios se eliminaba mediante 5 lavados de 250 µl de TPBS a cada pocillo.

La reacción de la peroxidasa conjugada a los anticuerpos secundarios se desarrollaba como en el apartado anterior, así como el bloqueo de la reacción. El tiempo de reacción variaba entre 30 minutos y 2 horas. Posteriormente se medía la absorbancia a 405 nm.

Cuando el test de ELISA se aplicaba a extractos crudos de raíces de *L. japonicus* se realizaba en las mismas condiciones anteriores, variando la concentración de proteína total de los extractos aplicada entre 0 y 5 µg, y usando una dilución de anticuerpos primarios de 1:1.000. La reacción de la peroxidasa en este caso se llevaba a cabo durante 20 horas, al cabo de las cuales se medía la absorbancia a 405 nm.

## **9. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.**

### **9.1. Aislamiento de RNA total de hojas y raíces de cebada.**

Para la obtención de preparaciones de RNA total se trabajó siempre con soluciones que habían sido tratadas con DEPC, para evitar la degradación de los RNA por ribonucleasas. Las soluciones, salvo las que contenían Tris, se preparaban en agua destilada y se les añadía DEPC a una dilución 1:1.000. Las soluciones se agitaban vigorosamente y se esterilizaban en autoclave tras 16 horas del tratamiento con DEPC. Las soluciones que contenían Tris se preparaban en agua destilada estéril previamente tratada con DEPC, esterilizándose mediante autoclave.

Los materiales de vidrio se esterilizaban durante 8 horas a 250°C, y el material de plástico desechable se esterilizaba en autoclave. Las centrifugaciones superiores a 1,5 ml se hicieron en tubos corex de vidrio, y las demás en tubos eppendorf.

La obtención de preparaciones de RNA total de hojas y raíces de cebada se llevaba a cabo usando indistintamente uno de los dos procedimientos siguientes:

### 9.1.1. Método de Jepson et al. (1991).

Este método, descrito para la obtención de RNA total a partir de pequeñas cantidades (50  $\mu\text{g}$ ) de tejidos de plantas, fue adaptado para la obtención de preparaciones de RNA total a partir de mayores cantidades de tejido (0,5 a 2 g de peso fresco).

El procedimiento seguido para 1 g de tejido fue el siguiente:

Las hojas y raíces de cebada eran trituradas en un mortero estéril en presencia de  $\text{N}_2$  líquido hasta conseguir un polvo fino. Antes de que el material se descongelara completamente se añadían 5 ml del tampón de homogeneización, que contenía Tris-HCl 50 mM pH 9,0, EDTA 5 mM, NaCl 0,4 M, SDS al 1% (p/v), DTT 10 mM, ácido aurín-tricarboxílico 1 mM y 4  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  de heparina, e inmediatamente 2,5 ml de una mezcla de fenol-cresol, preparada con fenol previamente saturado en el tampón de homogeneización y m-cresol al 10% (v/v). El material se homogeneizaba en la mezcla anterior a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaba a  $10.000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se recogía la fase acuosa tras la centrifugación y se añadían 1 ml de fenol, saturado en el tampón de homogeneización, y 1 ml de cloroformo:alcohol isoamílico en relación 24:1. La suspensión anterior se agitaba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba en las mismas condiciones que antes. La fase acuosa se volvía a extraer una vez más en la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y finalmente en la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico.

El RNA en la fase acuosa se precipitaba posteriormente con LiCl 12 M, para obtener una concentración final de 2 M. Tras incubar durante un mínimo de 3 horas a  $0^\circ\text{C}$ , se centrifugaba a  $10.000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , y el precipitado se lavaba por dos veces en etanol al 75% (v/v). Los restos del alcohol en el precipitado se eliminaban secando a vacío, y el precipitado se redisolvió en 1 ml de tampón Tris-HCl 5 mM pH 7,5. El RNA en la preparación anterior se sometía a una segunda precipitación con LiCl, esta vez durante 12-16 horas. Tras centrifugar, el precipitado se lavaba 2 veces en etanol al 75%, se secaba a vacío y se resuspendía en un volumen de 50 a 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril tratada con DEPC.

La cantidad de RNA total en las preparaciones obtenidas según el método anterior varió entre 150 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{g PF}^{-1}$ , siendo la relación  $A_{260/280 \text{ nm}}$  de 1,6 a 1,8.

### 9.1.2. Método de Chomczynsky y Sacchi (1987).

Este método fue aplicado para la obtención de preparaciones de RNA total a partir de 0,5 a 2 g de tejido de hojas y raíces de cebada.

Para 1 g de tejido el método se aplicó como se describe a continuación:

El material era triturado en un mortero en presencia de N<sub>2</sub> líquido, hasta conseguir un polvo fino. Cuando el material se descongelaba se añadían 10 ml de solución de desnaturalización (solución D), que contenía tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7,0, sarcosil al 0,5% (p/v) y 2-mercaptoetanol 0,1M. Tras homogeneizar el material en la disolución anterior durante el menor tiempo posible, se añadían 1 ml de una disolución de acetato sódico 2 M, pH 4, 10 ml de fenol, previamente saturado en agua destilada estéril tratada con DEPC, y 2 ml de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico preparada en relación 49:1, mezclando el material triturado tras la adición de cada uno de los reactivos. La suspensión anterior se transfería a un matraz estéril, se agitaba vigorosamente durante 10 segundos y se dejaba enfriar a 0°C durante 15 minutos. Para recuperar la fase acuosa la suspensión se centrifugaba a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Tras la centrifugación el RNA se separaba en la fase acuosa, mientras que las proteínas y el DNA estaban presentes en la interfase entre las fases acuosa y orgánica.

Posteriormente se añadía a la fase acuosa un mismo volumen de isopropanol y se incubaba a -20°C durante al menos 1 hora para precipitar el RNA. Después de centrifugar durante 15 minutos a 10.000 x g a 4°C, el precipitado se resuspendía en 3 ml de la solución D, y se sometía a una segunda precipitación con isopropanol. El RNA precipitado tras la centrifugación se lavaba dos veces con etanol al 75% (v/v), se secaba a vacío y se resuspendía en 50 a 100 µl de agua destilada estéril tratada con DEPC.

La cantidad de RNA obtenida por este método varió entre 200 y 470 µg·g PF<sup>-1</sup>, y la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280nm</sub> fue de 1,7 a 1,9.

## **9.2. Hibridación de RNA en filtros.**

### **9.2.1. Transferencia de RNA desde geles de agarosa-formaldehído a filtros de nylon.**

Una vez terminada la electroforesis de las preparaciones de RNA total, éstos eran transferidos desde el gel a filtros de nylon en un sistema de transferencia a vacío VacuGene (Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Antes de iniciar la transferencia a vacío, la membrana de nylon, de las mismas dimensiones que el gel, se incubaba durante 30 a 45 minutos en 20 x SSC (NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M). El gel se incubaba en la misma solución durante 15 minutos.

La membrana de nylon se colocaba en el sistema de transferencia, y, sobre ésta, el gel, y se añadía al sistema agua destilada tratada con DEPC, para lavar el formaldehído del gel aplicando vacío durante 5 minutos. Posteriormente se eliminaba el agua destilada y el gel se cubría con una solución de NaOH 50 mM y NaCl 10 mM, para permitir la hidrólisis alcalina

parcial de los RNA aplicando nuevamente vacío durante 5 minutos. A continuación se neutralizaba con una disolución de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 durante otros 5 minutos a vacío, y por último se realizaba la transferencia en la solución 20 x SSC durante 30 minutos a vacío. La presión de vacío se mantuvo entre 50 y 55 mbares durante todo el proceso.

Al finalizar la transferencia los filtros se lavaban durante 2 minutos en 20 x SSC y se secaban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente el RNA se inmovilizaba en los filtros secando éstos a 80°C a vacío total durante 90 minutos entre dos filtros Whatmann 3MM.

### 9.2.2. Marcaje radiactivo de sondas.

El marcaje radiactivo de sondas se llevó a cabo mediante la incorporación de nucleótidos marcados radiactivamente a las cadenas de DNA, utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Boehringer Mannheim) y cadenas hexanucleotídicas aleatorias como cebadores (Feinberg y Vogelstein, 1983).

Antes de la reacción de marcaje, el DNA se desnaturalizaba hirviendo en agua durante 15 minutos, y se enfriaba rápidamente durante 5 minutos a 0°C. A continuación se añadían dATP, dTTP, dGTP a una concentración final de 25 µM, 50 µCi de  $\alpha$ -<sup>32</sup>-P-dCTP, 4 pmoles de los hexanucleótidos cebadores y 2 U de enzima Klenow. La mezcla de reacción, de un volumen final de 20 µl, se incubaba durante 5 horas a 23°C, bloqueándose posteriormente por la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM.

La sonda de DNA marcada se separaba de los nucleótidos marcados no incorporados mediante filtración a través de Sephadex G-50 equilibrada en tampón TNE y empaquetada en una columna de 0,5 cm de diámetro y 2 cm de altura. La mezcla de reacción, diluída hasta un volumen final de 50 µl con tampón TNE, se aplicaba al gel anterior, seguido por adiciones sucesivas de 100 µl del mismo tampón, recogiendo fracciones de 0,1 ml y determinándose la radiactividad con un contador Geiger-Müller en cada una de las fracciones. Las fracciones que correspondían al primer pico de radiactividad se mezclaron, variando el volumen final entre 0,6 y 0,8 ml. La radiactividad específica determinada para una muestra alícuota colocada sobre un filtro en un contador de centelleo varió entre 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> cpm·µg<sup>-1</sup> de DNA.

### 9.2.3. Condiciones de hibridación.

Dado que se usaron sondas de DNA homólogas (fragmentos de DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII y la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT de cebada), o bien de DNA altamente conservado (rDNA), las hibridaciones se realizaron siempre en condiciones de alta estringencia.

Las membranas se prehibridaban durante al menos 5 horas (máximo 16 horas) a 42°C en la solución de prehibridación, que contenía: 5 x SSC, 5 x Denhardt, fosfato sódico 50 mM pH 6,5, SDS al 0,1% (p/v), formamida al 50% (v/v) y 100 µg·ml<sup>-1</sup> de fragmentos de DNA de esperma de arenque previamente desnaturalizado.

La solución de hibridación se preparaba añadiendo a la solución anterior la sonda de DNA marcado radiactivamente y desnaturalizado. La hibridación se realizaba a la misma temperatura durante 16 a 20 horas.

Posteriormente las membranas se lavaban por dos veces con 200 ml de solución 2 x SSC y SDS al 0,1% (p/v), durante 15 minutos cada vez, y tres veces con 200 ml de la solución 0,1 x SSC y SDS al 0,1% (v/v). Los lavados se realizaban a 68°C.

Tras los lavados, las membranas se dejaban secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro durante 5 minutos, y a continuación se colocaban entre dos láminas de plástico transparente dentro de cassettes de autorradiografía, provistas de pantallas intensificadoras de la señal. La exposición se realizó a -70°C, variando el tiempo de exposición entre 5 horas y 3 días.

#### 9.2.4. Rehibridación de filtros.

Para rehibridar las membranas, la sonda radiactiva era eliminada de éstas mediante un lavado durante 2 horas a 75°C en una disolución que contenía tampón Tris-HCl 1 mM pH 8,0, EDTA 1 mM y 0,1 x Denhardt. Posteriormente las membranas se lavaban durante 2 minutos en una disolución de 0,1 x SSPE (Sambrook et al., 1989). La eliminación de la radiactividad se verificó mediante exposición de autorradiografías durante 16 a 20 horas a -70°C.

## 10. REACTIVOS, APARATOS Y OTROS MATERIALES.

### 10.1. Reactivos.

Las sales usadas en grandes cantidades para la preparación de las soluciones de nutrientes y medios de cultivo, así como las sales de fosfato para la preparación de tampones, los ácidos acético y clorhídrico y los hidróxidos sódico y potásico fueron suministrados por Panreac.

Las sales usadas para la preparación de las soluciones de nutrientes y medios de cultivo fueron suministradas por Merck o Panreac, de quien también se adquirieron algunos líquidos como etilenglicol, 2-mercaptoetanol, peróxido de hidrógeno, metanol, etanol, y otros reactivos usados con fines

analíticos como sulfanilamida, N-(1-Naftil)-etiléndiamina, acetato de cadmio y ninhidrina. También fueron adquiridos de Merck el nitrato potásico, nitrito potásico, ditionito sódico, bicarbonato sódico, EDTA y TCA, así como el fenol sólido, que fue posteriormente redistilado a 180°C, y almacenado a -20°C protegido de la luz hasta su uso.

Otros reactivos tales como glutamina, glicina, 2-oxoglutarato, metil viológeno, NADH, aminooxiacetato, sulfato de protamina, PMSF, DTT, BSA, DEPC, heparina, tripsina, así como los reactivos para la preparación de tampones Tris, MOPS y HEPES fueron obtenidos de Sigma. También fueron adquiridas a Sigma las proteínas patrones para la determinación del peso molecular por SDS-PAGE.

Biorad suministró los reactivos usados en electroforesis, tales como TEMED, persulfato amónico, SDS, acrilamida, bis-acrilamida y Azul de bromofenol, y los reactivos Amidoblack y Azul de Coomassie R-250, así como la resina Dowex 1X8, y el reactivo para la determinación de proteína por el método de Bradford.

Los anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa y fosfatasa alcalina fueron suministrados por Sigma o Boehringer Mannheim, así como los reactivos como NBT, BCIP, ABTS. La proteína A-sepharosa fue asimismo suministrada por Sigma. También fueron adquiridos de Boehringer Mannheim la enzima Klenow, los desoxinucleótidos trifosfato y los hexanucleótidos cebadores. El sistema de inmunodetección ECL fue adquirido a Amersham. Los filtros de PVDP fueron suministrados por Millipore.

Los marcadores de RNA fueron adquiridos a Gibco BRL, y los filtros de nylon a Pall Biodyne. Amersham o Dupont suministraron los desoxinucleótidos marcados radiactivamente. La enzima Klenow, así como los

Las matrices de cromatografía DEAE-sefacel y Azul dextrano Sefarosa fueron adquiridas a Pharmacia, así como los geles de filtración Sefadex G-25 y G-50.

## **10.2. Aparatos.**

Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo de plantas de la marca SANYO, modelo SGR193.S26A. El cultivo de plantas en aire enriquecido en CO<sub>2</sub> se llevó a cabo en un incubador de plantas equipado con

un sistema de inyección automática de CO<sub>2</sub> controlada por infrarrojos modelo ADC 2000.

La esterilización de medios de cultivo, así como de disoluciones usadas en técnicas de biología molecular se realizó en autoclaves Selecta modelos Autester 437-G y 437-P, a una temperatura de 120°C y una sobrepresión de 1 atmósfera durante 20 minutos. El material de vidrio usado en técnicas de biología molecular se esterilizó en una estufa Heraeus durante 8 horas a 250°C.

Las pesadas se realizaron en balanzas Mettler, de los modelos PC 2200 y AE 160. Las determinaciones de pH se efectuaron usando un pH-metro Beckman de modelo  $\phi$  71.

Se usaron agitadores magnéticos de Selecta, modelo Agimatic, para la agitación de disoluciones, y para la agitación no magnética agitadores orbitales de Selecta de modelo Rotabit.

Las incubaciones a temperatura constante por encima de la temperatura ambiente se llevaron a cabo en baños termostatzados de Selecta, modelo Tectron S-543. Los materiales vegetales, preparaciones de RNA, así como otras muestras se almacenaron a -80°C en ultracongeladores SANYO Ultra Low, o Koxka. Para el almacenamiento de muestras a -20°C y 4°C se usaron congeladores y frigoríficos de Liebherr.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada Beckman J2-21, con rotores JA-20 y JA-14, o Sorval RC-5B. Cuando se centrifugaron muestras de volúmenes inferiores a 1,5 ml se usó una centrifuga de mesa Heraeus, modelo Biofuge 13, que se mantuvo en una cámara refrigerada a 4°C cuando fue necesario.

El desecado a vacío de muestras de RNA se efectuó en una centrifuga a vacío Gyro Vap de Howe. El secado de filtros a 80°C se llevó a cabo en una estufa a vacío Selecta. Ambos equipos estaban conectados a una línea de vacío acoplada a una bomba Telstar.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetros ultravioleta-visible de Beckman, modelo DU-7, o Shimadzu UV-1203. Se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz para longitudes de onda inferiores o iguales a 340 nm, y cubetas de vidrio o plástico para longitudes de onda superiores. Las medidas de absorbancia más rutinarias se hicieron en un lector de ELISA Multiskan plus de Menarini, para las determinaciones espectrofotométricas a 540 nm, 506 nm y 405 nm, usándose placas de microtítulo de 96 pocillos, y rellenando cada pocillo con 0,3 ml de cada

muestra. En estas condiciones se obtenían los mismos valores de absorbancia que en el espectrofotómetro.

Las cromatografías se realizaron en una cámara refrigerada a 4°C en columnas de vidrio. Se usaron bombas peristálticas P1 y microperpex 2132, y colectores de fracciones frac-100 y Redirac 2112 de Pharmacia. La absorbancia a 280 nm se registró de forma continua usando un monitor ultravioleta Uvicord SII, modelo 2238 acoplado a un registrador modelo 2210, ambos de LKB. Las cromatografías en Sefadex G-25, Sefadex G-50 y Dowex 1X8, de corta duración, se realizaron a temperatura ambiente. El fraccionamiento de extractos crudos por filtración se llevó a cabo en una célula de filtración AMICON 8050.

Las electroforesis de proteínas se realizaron en un sistema de electroforesis vertical 2001 de LKB. Las electroforesis de RNA se llevaron a cabo en una unidad de electroforesis horizontal de LKB, modelo Maxiphor 2012.

Para la electrotransferencia de proteínas se utilizó un equipo Novablot acoplado a una cubeta modelo Multiphor II 2117 de LKB. La transferencia de RNA a vacío se realizó en un sistema VacuGene de Pharmacia.

La emisión de partículas  $\beta$  por muestras radiactivas se cuantificó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 6000IC, con un programa automático para  $^{32}$ -P. Otras determinaciones de radiactividad se hicieron directamente en los tubos o filtros con un contador Geiger-Müller.

Las hibridaciones de filtros con sondas marcadas radiactivamente se realizaron en una estufa de hibridación modelo Ecogen, o en el sistema Milliblot de Millipore.

El agua utilizada en todos los experimentos fue desionizada por un sistema desionizador Aqualab (Afora) y posteriormente a través de un sistema Mili RO 6 Plus de Millipore o alternativamente destilada en un destilador Aquatron A8S. Para los experimentos con RNA se usó agua de calidad Milli Q esterilizada en autoclave.

Las películas autorradiográficas usadas fueron de marca Konica, y las fotografías de filtros, geles y autorradiografías fueron obtenidas con una cámara Minolta X-300 con lente de aproximación, usando una película Kodalith.

### **10.3. Otros materiales.**

Los semilleros, macetas y bandejas usadas para el cultivo de las plantas fueron suministradas por El Corte Inglés y Viveros Guadalquivir. La vermiculita fue adquirida a PQS y Casa Torrecilla. La turba finlandesa fue adquirida a Viveros Jardín del Rocío, y la perlita a PQS.

El nitrógeno líquido se obtuvo del servicio de criogenia de la Universidad de Sevilla, y los gases como anhídrido carbónico y nitrógeno de la Sociedad Española del Oxígeno.

***RESULTADOS Y DISCUSION I.  
REGULACION DE LA EXPRESION DE LA  
FERREDOXINA-GLUTAMATO SINTASA DE  
CEBADA***

## 1. EXPRESIÓN DE LA Fd-GOGAT EN HOJAS Y RAÍCES DE CEBADA.

### 1.1. Niveles de expresión de la Fd-GOGAT en hojas y raíces de plantas maduras de cebada.

Aunque la Fd-GOGAT es una enzima que usa como donador de electrones fisiológico la ferredoxina reducida fotosintéticamente, en diversas plantas se ha descrito la presencia de esta enzima en tejidos no fotosintéticos, como pueden ser las raíces (Matoh y Takahashi, 1982; Suzuki et al., 1982). En plantas de cebada la actividad de la Fd-GOGAT pudo detectarse en hojas y raíces, si bien el nivel de actividad que se pudo medir en raíces fue aproximadamente del 3% del de hojas expresado en relación al peso fresco de material (Tabla 1). Esta relación aumentaba hasta un 25% cuando las actividades de ambos tejidos se compararon en base a la proteína total, ya que el nivel de proteína total en raíces era sustancialmente más bajo que el de hojas.

Tabla 1. Comparación de algunos parámetros de la Fd-GOGAT de hojas y raíces de cebada.

	Hojas	Raíces
Proteína total (mg·g PF <sup>-1</sup> )	8,6	1,0
Actividad Fd-GOGAT total (nKat·gPF <sup>-1</sup> )	28,3	0,8
Actividad específica Fd-GOGAT en extractos crudos (nKat· mg proteína <sup>-1</sup> )	3,3	0,8
Proteína Fd-GOGAT estimada (%) en proteína soluble (valor máximo)	1,4	0,3
Masa molecular (kDa)	160	160

Los datos mostrados en la tabla son los valores medios en los tejidos de plantas de un mes.

La Fig. 9 A muestra el análisis de la proteína total de extractos crudos de hojas y raíces de cebada mediante tinción con Amidoblack, en la que puede detectarse la proteína de 160 kDa correspondiente a la Fd-GOGAT en los extractos de hojas. Con la misma carga de proteína total de los extractos de raíces, el nivel de proteína Fd-GOGAT resultó ser prácticamente indetectable. Cuando se analizó la proteína Fd-GOGAT en extractos crudos de hojas y raíces, que contenían la misma actividad enzimática y una relación de proteína total aproximada de 1:5, mediante inmunodetección en filtro con

los anticuerpos específicos anti-Fd-GOGAT obtenidos frente a la enzima purificada de hojas de cebada (Márquez et *al.*, 1988) pudo detectarse en ambos tejidos la proteína del mismo tamaño correspondiente a la Fd-GOGAT (Fig. 9 B). Estos datos a nivel de proteína son consistentes con los niveles de actividad enzimática determinados en ambos tejidos (Tabla 1). Los anticuerpos anteriores reconocían en los extractos crudos de ambos tejidos otras dos proteínas de menor tamaño que no fueron detectadas con los anticuerpos del suero preimmune (Fig. 9 C) y que serán analizadas en el Apdo. 2.

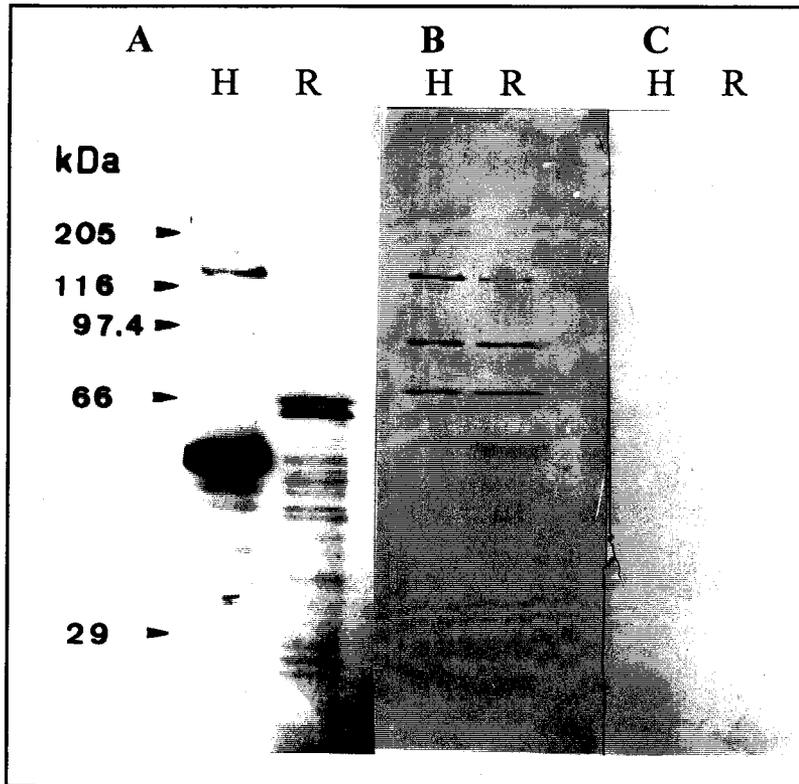


Fig. 9. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la Fd-GOGAT de hojas y raíces de cebada. 0,66 nKat de actividad MV-GOGAT de extractos crudos de hojas (H) y raíces (R) de plantas de 11 días, que corresponden a 150 y 720  $\mu$ l de proteína total de los extractos de hojas y raíces respectivamente, se analizaron mediante electroforesis e inmunodetección en filtro con anticuerpos anti-Fd-GOGAT (B) o con la misma fracción del suero preimmune (C). La figura (A) muestra el análisis mediante tinción en filtro con Amidoblack de 200  $\mu$ g de la proteína total de los extractos de hojas y raíces.

La abundancia relativa del mRNA de la Fd-GOGAT en hojas y raíces se determinó mediante Northern blot usando como sonda el clon de cDNA de la Fd-GOGAT de cebada (Avila et *al.*, 1993). Dicha sonda reconocía en Northern un mRNA de aproximadamente 5.5 Kb en las preparaciones de RNA total de hojas. Sin embargo, en las mismas preparaciones de raíces el

mRNA de la Fd-GOGAT resultó ser indetectable, a pesar de que se usaron distintos métodos para la obtención de las preparaciones de RNA total (Fig. 10). Cuando se hibridaban preparaciones de polyA<sup>+</sup>-RNA de raíces de plantas cultivadas con nitrato en cultivos hidropónicos con la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT pudo detectarse un mRNA del mismo tamaño que el de hojas (no mostrado). Estos resultados indican una notable diferencia en los niveles de expresión de la Fd-GOGAT en ambos tejidos que es acorde con las diferencias encontradas a nivel de actividad enzimática.

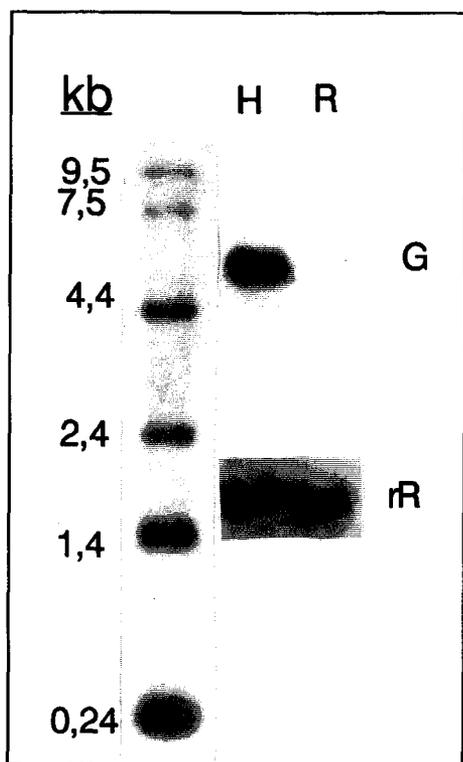


Fig. 10. Análisis mediante Northern blot de la abundancia del mRNA de la Fd-GOGAT en hojas y raíces de cebada. Las preparaciones de RNA total fueron obtenidas a partir de 1 g de material completo de hojas (H) y raíces (R) de plantas de 1 mes (método de Jepson et al., 1991). 30  $\mu$ g de cada preparación se separaron mediante electroforesis en agarosa-formaldehído, y se hibridaron a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT (G) de cebada y a la sonda de cDNA del rRNA 18 S (rR) como control de la cantidad de RNA cargado.

En tabaco (Zehnacker et al., 1992) y en pino (García-Gutiérrez et al., 1995) se ha descrito una expresión específica de órgano de la Fd-GOGAT, no detectándose en raíces ni la proteína ni el transcrito de la Fd-GOGAT. En maíz, Sakakibara et al. (1992a) han descrito niveles detectables del mRNA de la Fd-GOGAT en raíces, aunque menores que en hojas, que apoyan resultados anteriores a nivel de actividad enzimática (Suzuki et al., 1987). El distinto nivel de expresión de la Fd-GOGAT en tejido fotosintético y no fotosintético podría indicar una distinta función de la enzima en cada tejido. En raíces, donde no opera la fotorrespiración, se considera que el ciclo GS/GOGAT estaría implicado en la asimilación primaria de amonio (Lam et al., 1996).

Bowsher et al. (1992, 1989) han descrito que el poder reductor para la

Fd-GOGAT y la Fd-NiR en plastos aislados de raíces de guisante procede del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato. En plastos de raíces de cebada, Oji et al. (1985) han referido la presencia de las actividades glucosa -6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas, que generan el NADPH requerido. Por otra parte, se ha comprobado la presencia de isoformas de ferredoxina y Fd-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa (FNR) específica para raíces y frutos no verdes (Green et al., 1991; Morigasaki et al., 1990; Suzuki et al., 1985), de manera que los componentes necesarios para la reducción de ferredoxina a partir del NADPH generado en el ciclo de las pentosas-fosfato están presentes en raíces.

## 1.2. Comparación inmunológica de la enzima Fd-GOGAT en hojas y raíces de cebada.

Una cuestión interesante era determinar si la Fd-GOGAT de hojas y raíces de cebada eran la misma enzima o podrían corresponder a formas isoenzimáticas. Suzuki et al. (1982) propusieron que existían dos isoformas de Fd-GOGAT en arroz, una específica de raíces y otra de hojas, que poseen determinantes antigénicos relacionados pero no idénticos. Estos resultados en arroz plantean la posibilidad de la existencia de más de una copia del gen por genoma. Recientemente se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* la presencia de dos genes para la Fd-GOGAT (Lam et al., 1995; 1996), uno de los cuales se expresa a altos niveles en hojas y a bajos niveles en raíces, y es inducible por luz y sacarosa, y un segundo gen que se expresa constitutivamente a muy bajos niveles en hojas y a mayores niveles en raíces. Los mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT aislados en esta planta presentan alteración en el gen que se expresa a altos niveles en hojas, y a pesar de la existencia de otro gen, estas plantas muestran un fenotipo mutante cuando se cultivan en condiciones fotorrespiratorias, posiblemente debido al distinto patrón de expresión de cada uno de los genes en hojas y raíces, donde cumplirían distintas funciones (Lam et al., 1996). En cebada, sin embargo, estudios anteriores indicaban la presencia de una sola copia del gen de la Fd-GOGAT por genoma, como es el hecho de que los mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT muestren niveles de actividad reducidos hasta un 6% de los del tipo silvestre tanto en hojas como en raíces, lo cual indica que estas actividades están bajo el control del mismo gen (Kendall et al., 1986; Avila et al., 1993). Una sola copia del gen de la Fd-GOGAT se ha referido también en maíz (Sakakibara et al., 1991), en espinaca (Nalbantoglu et al., 1994) y en *Nicotiana sylvestris* (Zehnacker et al., 1992).

Los anticuerpos policlonales específicos obtenidos frente a la

Fd-GOGAT purificada de hojas de cebada (Márquez et al., 1988) se han usado para estudiar la posible identidad inmunológica de las enzimas de hojas y raíces. La Fig. 11 muestra las curvas de inmunoinhibición de la actividad de la Fd-GOGAT en las incubaciones de extractos crudos de hojas y raíces de cebada con cantidades crecientes de IgG anti-Fd-GOGAT. 1,25 nkat de actividad MV-GOGAT de los extractos de hojas y raíces fueron completamente inhibidas con 1 y 3  $\mu\text{l}$  de IgG respectivamente. A 1  $\mu\text{l}$  de anticuerpos pudo detectarse una diferencia en la proporción de actividad inmunoinhibida en los extractos de ambos tejidos. Sin embargo, esta diferencia posiblemente no sea significativa, ya que el nivel de inmunoinhibición en este punto era mayor para la enzima de raíces, aunque los anticuerpos habían sido obtenidos frente a la enzima de hojas. Estos datos sugerían que la enzima de ambos tejidos era de una gran similitud antigénica.

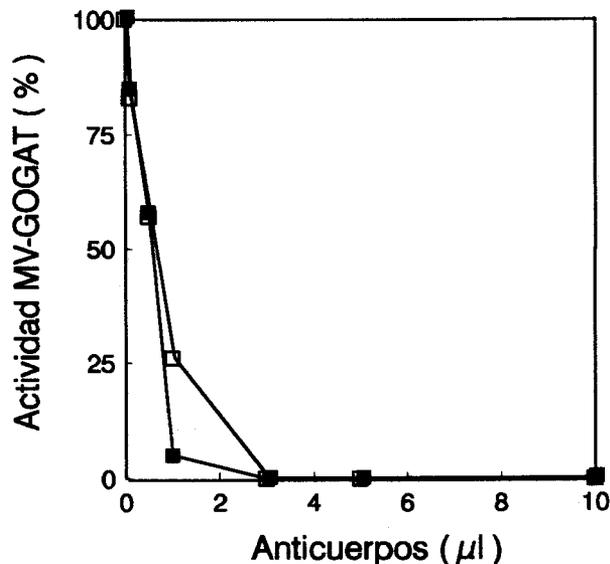


Fig. 11. Inmunotitulación de la Fd-GOGAT de hojas y raíces de cebada con anticuerpos anti-Fd-GOGAT purificada de hojas de cebada. 1,25 nkat de actividad MV-GOGAT de extractos crudos de hojas ( $\square$ - $\square$ ) y raíces ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) de cebada fueron incubados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 14 horas con cantidades crecientes de la fracción de IgG anti-Fd-GOGAT ( $4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Las muestras se incubaron posteriormente con 5 mg de proteína A-sefarosa durante 30 minutos a temperatura ambiente, y centrifugadas. La actividad MV-GOGAT fue determinada en los sobrenadantes.

## 2. PROTEOLISIS DE LA Fd-GOGAT EN EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS Y RAÍCES DE CEBADA.

Como se muestra en la Fig. 9 B del Apdo. 1.1., los anticuerpos específicos anti-Fd-GOGAT reconocían además de la proteína de 160 kDa, otros dos polipéptidos de 69 y 96 kDa tanto en los extractos de hojas como en

los de raíces. Varias evidencias nos llevaban a considerar estas proteínas como fragmentos de degradación proteolítica de la Fd-GOGAT:

- a) Si se supone que hay una sola copia del gen de la Fd-GOGAT por genoma en cebada, difícilmente estos dos péptidos podrían corresponder a otras formas isoenzimáticas.
- b) Los anticuerpos policlonales que reaccionan con estas proteínas fueron obtenidos frente a la Fd-GOGAT purificada, consistente en un único polipéptido de 154 kDa. Dichos anticuerpos inmunoprecipitan en los extractos crudos de hojas de cebada una única proteína del mismo peso molecular (Márquez et al., 1988).
- c) En el control con anticuerpos del suero preinmune no pudo detectarse ninguna de estas proteínas (Fig. 9 C).
- d) La suma de las masas de los fragmentos coincidía razonablemente con la masa molecular estimada de la proteína intacta.

Para reafirmar la posibilidad de que estos péptidos fueran fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT que se produjeran *in vitro*, se incubaron muestras de los extractos crudos frescos de hojas de cebada a  $-80^{\circ}\text{C}$  ó a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas. La Fig. 12 B muestra el análisis mediante inmunodetección en filtro de los extractos anteriores. Los péptidos de 69 y 96 kDa pudieron detectarse en el extracto incubado a  $20^{\circ}\text{C}$  pero no en el extracto mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$ , lo cual indica que podrían corresponder a fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT cuya producción *in vitro* se protege si el extracto se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La actividad enzimática de la Fd-GOGAT dependiente de metil viológeno o ferredoxina se determinó en los extractos almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  o incubados a  $20^{\circ}\text{C}$ . El nivel de actividad MV-GOGAT y Fd-GOGAT en el extracto recién obtenido fue similar, como se ha descrito anteriormente (Márquez et al., 1988). En las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se mantuvo el 100% de la actividad inicial tanto con metil viológeno como con ferredoxina reducidos como donadores de electrones. Sin embargo, en las incubaciones a  $20^{\circ}\text{C}$  pudo determinarse el 100% de la actividad inicial con metil viológeno, pero sólo se recuperó entre un 11 y 19% de la actividad inicial cuando se usó ferredoxina reducida como donador de electrones (Fig. 12 A). Estos resultados indican que ambas actividades enzimáticas se ven afectadas de distinta manera al producirse los fragmentos proteolíticos. Cuando los extractos incubados a  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $20^{\circ}\text{C}$  se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturizantes e inmunodetección en filtro con los

anticuerpos anti-Fd-GOGAT, pudo detectarse una diferencia en la movilidad electroforética de la Fd-GOGAT entre las preparaciones mantenidas a 20°C y a -80°C (Fig. 12 C). Este resultado confirmaría la proteólisis de la Fd-GOGAT.

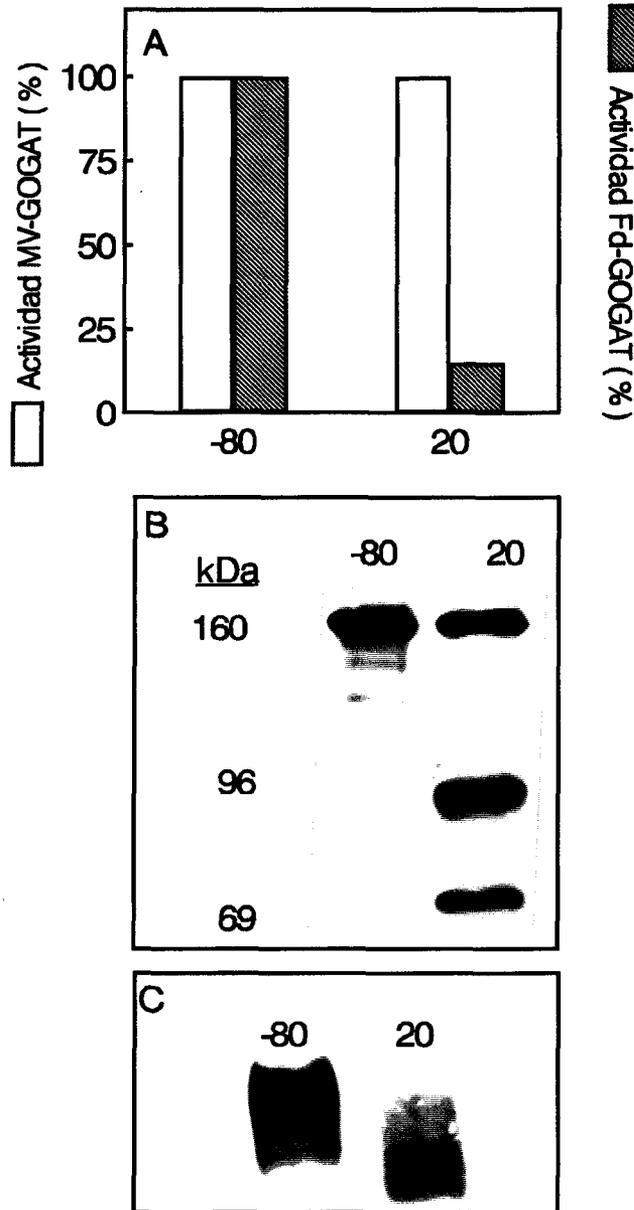


Fig. 12. Efecto de la proteólisis de la Fd-GOGAT sobre los niveles de actividad enzimática dependiente de metil viológeno y ferredoxina. Partes alícuotas de un mismo extracto crudo de hojas de cebada de 10 días se mantuvieron durante 20 horas a -80°C ó 20°C. Las actividades MV- y Fd-GOGAT fueron determinadas tras la incubación, y se refieren como porcentaje respecto a las actividades en el extracto crudo recién preparado (13 nkat·ml<sup>-1</sup> de actividad MV-GOGAT y 16 nkat·ml<sup>-1</sup> de actividad Fd-GOGAT) (A). La proteína Fd-GOGAT en las incubaciones fue analizada mediante inmunodetección tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes (B) o no desnaturalizantes (C).

Esta profundización efectuada sobre la proteólisis de Fd-GOGAT que se detecta en los extractos crudos pensamos que era de extrema importancia por las siguientes razones:

- a) Dado que con metil viológeno se alcanzan para esta proteína niveles de actividad similares a los que se alcanzan con ferredoxina, es muy frecuente el uso de metil viológeno como donador de electrones. Según hemos demostrado, la proteólisis que tiene lugar en los extractos afectaría a la actividad dependiente de ferredoxina, infraestimando el valor real de actividad que podría haber en los extractos. Por otra parte, si por alguna circunstancia en la célula hubiera mayor nivel de proteólisis de esta proteína produciéndose los fragmentos señalados, la actividad con metil viológeno sería una mala estimación de actividad pues se determinaría mucha actividad donde con ferredoxina no sería operativa.
- b) Por otra parte, sin pretenderlo, habíamos encontrado una forma de diferenciar estructural y funcionalmente las actividades con metil viológeno y ferredoxina, que aparentemente están asociadas a distintos dominios proteolíticos de la proteína.

En maíz se han descrito también fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT de 73 y 88 kDa (Sakakibara et al., 1991). Los autores proponen que dichos fragmentos se producen *in vitro* durante el proceso de purificación de la Fd-GOGAT, ya que no se detectan en los extractos frescos. La secuencia de aminoácidos de estos fragmentos ha llevado a establecer que el fragmento de 73 kDa corresponde a la región N-terminal de la proteína, y el de 88 kDa a la región C-terminal. En pino también se han descrito fragmentos de tamaños similares (90 y 70 kDa) que se detectan en preparaciones purificadas de la Fd-GOGAT, aunque no en extractos crudos frescos, y que se copurifican con la proteína intacta (García-Gutiérrez et al., 1995). Estos datos podrían indicar la presencia de un sitio lábil susceptible de proteólisis en las Fd-GOGATs. Si la situación en cebada es similar a la que se ha descrito en maíz, los fragmentos de 69 y 96 kDa corresponderían respectivamente a las regiones N y C-terminal de la proteína intacta.

Los datos de la secuencia de distintos clones, totales o parciales, del gen de Fd-GOGAT de los que se dispone hasta ahora coinciden en la localización de los dominios de unión a los sustratos y de los centros FMN y [3Fe-4S] en dos zonas distintas de la misma cadena polipeptídica: por una parte, se ha identificado un dominio de unión a glutamina en la región N-terminal de las Fd-GOGATs (Avila et al., 1993; Nalbantoglu et al., 1994; Navarro et al., 1995), que es homólogo al mismo dominio en las glutamina-

amidotransferasas de tipo *pur-F*. Por otra parte, se han identificado los dominios de unión al FMN, y al centro [3Fe-4S] en la región C-terminal de la Fd-GOGAT (Sakakibara et al., 1991; Nalbantoglu et al., 1994; Navarro et al., 1995). Suzuki et al. (1994), mediante el uso de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la Fd-GOGAT de tabaco, determinaron que el dominio de interacción con la ferredoxina solapaba parcialmente con el sitio de unión del metil viológeno en la cadena polipeptídica de la Fd-GOGAT. Recientemente se ha descrito que los distintos residuos de aminoácidos cargados positivamente que podrían interaccionar con la ferredoxina están repartidos a lo largo de la secuencia de la Fd-GOGAT (Suzuki y Rothstein, 1997). Teniendo en cuenta todos estos datos podría sugerirse que los dos fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT de cebada se corresponderían con dos partes funcionales en la misma cadena polipeptídica, un dominio glutamina amidotransferasa en la región N-terminal, y un dominio de los centros de transferencia de electrones en la región C-terminal, que pueden estar estrechamente relacionados durante la catálisis enzimática. Resulta, pues, difícil de entender con los datos disponibles cómo uno de los fragmentos proteolíticos podría retener la actividad con metil viológeno. Lo que sí parece manifiesto es que la ruptura proteolítica de la Fd-GOGAT afecta a la interacción de ésta con la ferredoxina. Teniendo en cuenta estos datos hemos planteado dos posibles hipótesis para explicar los resultados obtenidos en relación con las actividades MV-GOGAT y Fd-GOGAT en extractos donde pueden detectarse fragmentos proteolíticos:

- a) Aunque la cadena polipeptídica de la Fd-GOGAT se rompa en dos fragmentos, éstos podrían permanecer unidos por uniones intracatenarias. La hidrólisis de la cadena polipeptídica podría inducir a la desestabilización de la interacción con la ferredoxina pero no con el metil viológeno como donador de electrones. Esta hipótesis no se ve apoyada por la alteración de la movilidad electroforética de la Fd-GOGAT nativa y de la que ha sido sometida a proteólisis (Fig. 12 C).
- b) Otra posibilidad sería que cuando la cadena polipeptídica se rompe en dos fragmentos, éstos no permanecieran unidos. Esto indicaría que uno de los fragmentos, probablemente el que corresponde a la región C-terminal y que contiene los centros de transferencia de electrones, debería retener la actividad con metil viológeno, pero no con ferredoxina. Esta situación obligaría a suponer, por una parte, que habría un dominio de unión de glutamina en la región C-terminal de la Fd-GOGAT y, por otra, que habría residuos de aminoácidos esenciales para la interacción con la ferredoxina en la región N-terminal de la Fd-GOGAT. Zehnacker et al. (1992)

suponer, por una parte, que habría un dominio de unión de glutamina en la región C-terminal de la Fd-GOGAT y, por otra, que habría residuos de aminoácidos esenciales para la interacción con la ferredoxina en la región N-terminal de la Fd-GOGAT. Zehnacker et al. (1992) identificaron en la secuencia parcial de la Fd-GOGAT de tabaco una zona de 20 aminoácidos en la región C-terminal de una identidad del 100% con las mismas secuencias en la enzima de maíz y en la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli*. Los autores asociaron tentativamente esta secuencia a la función glutamina amidotransferasa de las GOGATs, ya que la subunidad grande de la enzima de *E. coli* se sabe que posee dicha actividad (Trotta et al., 1974). Sin embargo, Navarro (1996) ha considerado esta región fuertemente conservada como una secuencia importante para una determinada conformación en las GOGATs. Un esquema tentativo de la localización de los dominios proteolíticos, así como de los sitios de unión de los grupos prostéticos y de los sustratos se muestra en la Fig. 13.

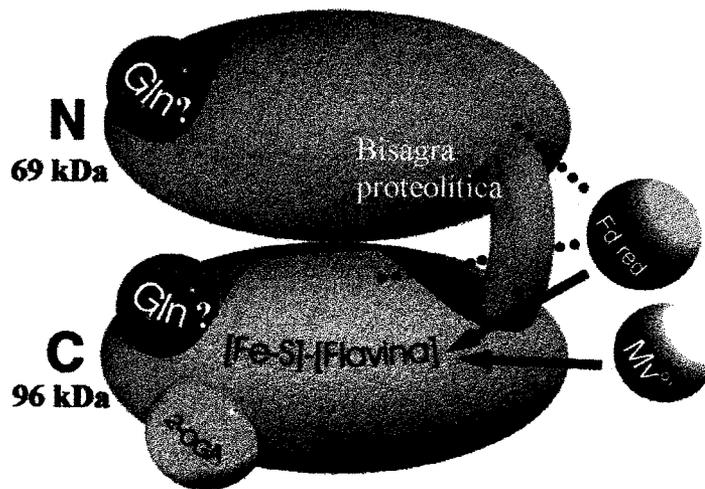


Fig. 13 . Esquema tentativo de la localización de los grupos prostéticos y sitios de unión a los sustratos en los dominios proteolíticos de la Fd-GOGAT.

Ya que los fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT podían detectarse cuando los extractos eran obtenidos en el tampón rutinario, que contenía protectores de la acción de proteasas (EDTA, PMSF,

mediante inmunodetección en filtro de extractos preparados en el tampón completo o en tampón fosfato solo sin aditivos, incubados ambos a distintas temperaturas durante distintos tiempos. En tampón fosfato no se detectaron los fragmentos aunque la estabilidad de la actividad enzimática fue mucho menor. Es posible que en nuestro caso la ausencia de 2-mercaptoetanol proteja de la aparición de los fragmentos proteolíticos como en el caso de la enzima de maíz (Sakakibara et al., 1991).

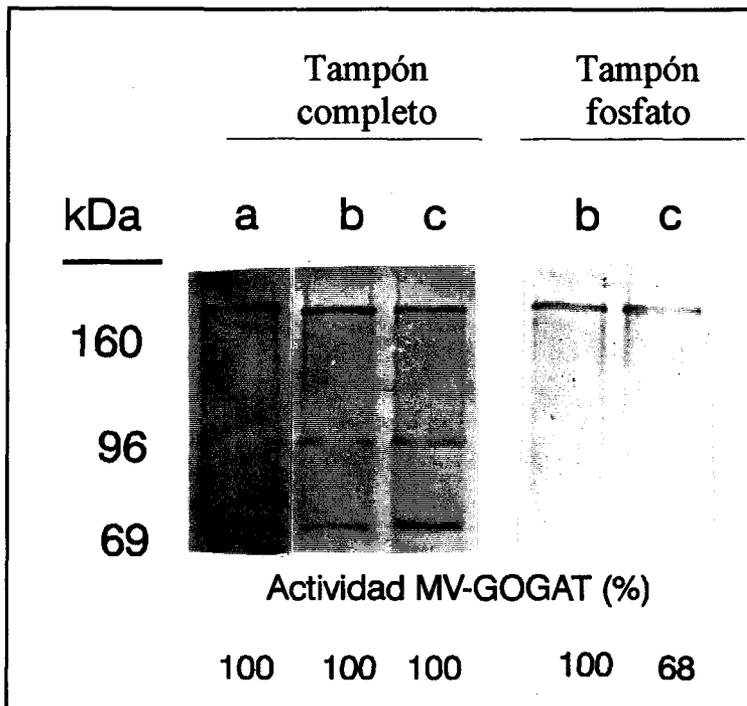


Fig. 14. Efecto del tampón sobre la proteólisis de la Fd-GOGAT. A partir de la primera hoja de plantas de cebada de 10 días se obtuvieron extractos crudos, bien en el tampón de extracción rutinario, o en fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Partes alicuotas de los extractos se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  (a),  $4^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas (b), ó  $20^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas (c). 200  $\mu\text{g}$  de proteína total de cada muestra se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección en filtro con los anticuerpos anti-Fd-GOGAT. En la línea inferior se indica la actividad MV-GOGAT en las distintas muestras, expresada como porcentaje de actividad recuperada respecto de la actividad inicial (2,45 nkat-mg proteína $^{-1}$  en tampón fosfato, y 3,1 nkat-mg de proteína $^{-1}$  en el tampón de extracción completo).

Aunque la aparición de los fragmentos proteolíticos de la Fd-GOGAT parece producirse *in vitro* según lo mencionado anteriormente, pensamos que estos datos podrían guardar también una relación con el estado de actividad de la Fd-GOGAT *in vivo*. La Fd-GOGAT es una proteína marcadamente estable.

En los westerns mostrados ha podido observarse que la banda de proteína, a excepción de los fragmentos proteolíticos, se mantiene durante largos periodos de tiempo, y así también ocurre con la actividad dependiente de metil viológeno. Sin embargo, la actividad enzimática con ferredoxina, su donador fisiológico, es mucho más lábil y puede perderse con la proteólisis en un único lugar de la cadena polipeptídica. No es descabellado pensar que la proteólisis de la Fd-GOGAT pueda constituir una forma de regulación de su actividad enzimática *in vivo*, en respuesta a diferentes situaciones, al igual que se da en otras muchas proteínas.

### **3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA Fd-GOGAT DURANTE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CEBADA.**

La evolución de la expresión de la Fd-GOGAT durante la germinación de semillas y el desarrollo posterior de plantas de cebada se ha analizado a nivel de actividad enzimática, proteína y mRNA.

Como se recoge en la Tabla 2, la actividad de la Fd-GOGAT fue prácticamente indetectable en semillas secas y en plántulas hasta el cuarto día a partir de la siembra. En este estado la actividad enzimática era muy baja, y el 90% se localizó en la parte aérea de las plántulas, mientras que permanecía a niveles bajos sin grandes oscilaciones en raíces. Por el contrario, en hojas la actividad enzimática experimentaba un fuerte incremento, de más de 20 veces, entre los días 4 y 5 después de la siembra, coincidiendo con la expansión de la primera hoja.

La proteína Fd-GOGAT, analizada mediante inmunodetección en filtro, mostró una evolución similar a la observada a nivel de actividad enzimática, siendo únicamente detectable en la primera hoja de las plántulas en proceso de expansión (Fig. 15), lo cual indica que el incremento de la actividad enzimática de la Fd-GOGAT durante la expansión de la primera hoja se debe a síntesis *de novo* de la proteína. En plántulas germinadas en oscuridad se observó un comportamiento similar (resultado no mostrado).

Tabla 2. Evolución de la actividad Fd-GOGAT durante las primeras etapas del desarrollo en cebada.

Material	Actividad Fd-GOGAT [nkat·(gPF) <sup>-1</sup> ]	Proteína total [mg·(gPF) <sup>-1</sup> ]
Semillas secas	0	20,8
Plántulas (1 día)	0	13,3
Plántulas (2 días)	0,8	13,7
Plántulas (3 días)	1,3	13,2
Plántulas (4 días)	2,2	10,9
vástagos	2,0	7,2
raíces	0,3	3,0
Primera hoja (5 días)	51,7	19,6
Raíces maduras (10 días)	0,8	3,0

La actividad enzimática dependiente de ferredoxina y la proteína soluble total en extractos de los materiales indicados se determinó como se describe en *Materiales y Métodos*.

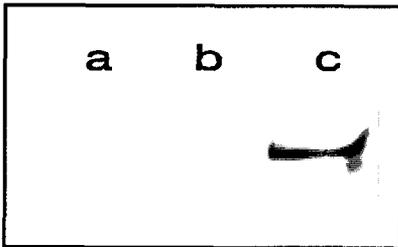


Fig. 15. Evolución de la proteína Fd-GOGAT en las primeras etapas del desarrollo de cebada. 200  $\mu$ g de proteína total de extractos crudos de los materiales: semillas secas (a), plántulas de 4 días (b), y la primera hoja de plantas de cebada de 6 días cultivadas en presencia de luz (c) se analizaron mediante electroforesis en SDS e inmunodetección en filtro con los anticuerpos anti-Fd-GOGAT.

Durante el desarrollo de las plantas de cebada posterior a 7 días, los niveles de actividad, proteína y mRNA de la Fd-GOGAT se determinaron en la primera hoja a distintos tiempos desde la siembra de las plantas germinadas bien en presencia o ausencia de luz.

La actividad Fd-GOGAT, expresada tanto en relación al peso fresco como a la proteína total, (Fig. 16 A y Tabla 3) siguió aumentando desde el día 5 hasta alcanzar un máximo hacia el día 10 después de la siembra (días 6-7 después de la germinación). Este incremento en la actividad enzimática entre

los días 4 y 10 también se produjo, aunque a menores niveles, cuando las plantas germinaron y crecieron en ausencia de luz (Fig. 16 A). A partir del décimo día la actividad Fd-GOGAT disminuyó hasta alcanzar aproximadamente un 50% del valor máximo hacia el día 30 después de la siembra.

En lo que respecta a los niveles de proteína Fd-GOGAT, éstos se analizaron mediante inmunodetección en filtro de muestras de los extractos crudos de la primera hoja entre los días 7 y 30 después de la siembra. La Fig. 16 B muestra que la disminución en los niveles de actividad enzimática durante este periodo era acompañada de una disminución en los niveles de proteína Fd-GOGAT, tanto en el tejido verde como en el etiolado, si bien ésta se hace sobre todo ostensible a partir de los días 15 y 20 después de la siembra. En ambos casos, el nivel de proteína Fd-GOGAT era muy bajo en los días 25 y 30. En estos materiales más maduros se detectaron los fragmentos de 69 y 96 kDa, lo que posiblemente se deba a una mayor actividad proteolítica en los extractos crudos de dichos materiales.

Los niveles de mRNA de la Fd-GOGAT fueron determinados en la primera hoja de plantas cultivadas en presencia y ausencia de luz. Durante los días 7 y 30 después de la siembra se analizaron mediante Northern blot (Fig. 16 C). En el tejido verde el nivel del mRNA se mantuvo alto y constante hasta el día 20, pero disminuyó considerablemente hacia el día 25. En el tejido etiolado, el nivel de mRNA de la Fd-GOGAT en el mismo periodo fue muy bajo y sólo detectable en la primera hoja de plantas de 7 días.

Estos resultados en conjunto indican que los cambios en los niveles de la enzima Fd-GOGAT observados durante el desarrollo de plantas de cebada obedecen posiblemente a un control de tipo transcripcional de la expresión de la Fd-GOGAT.

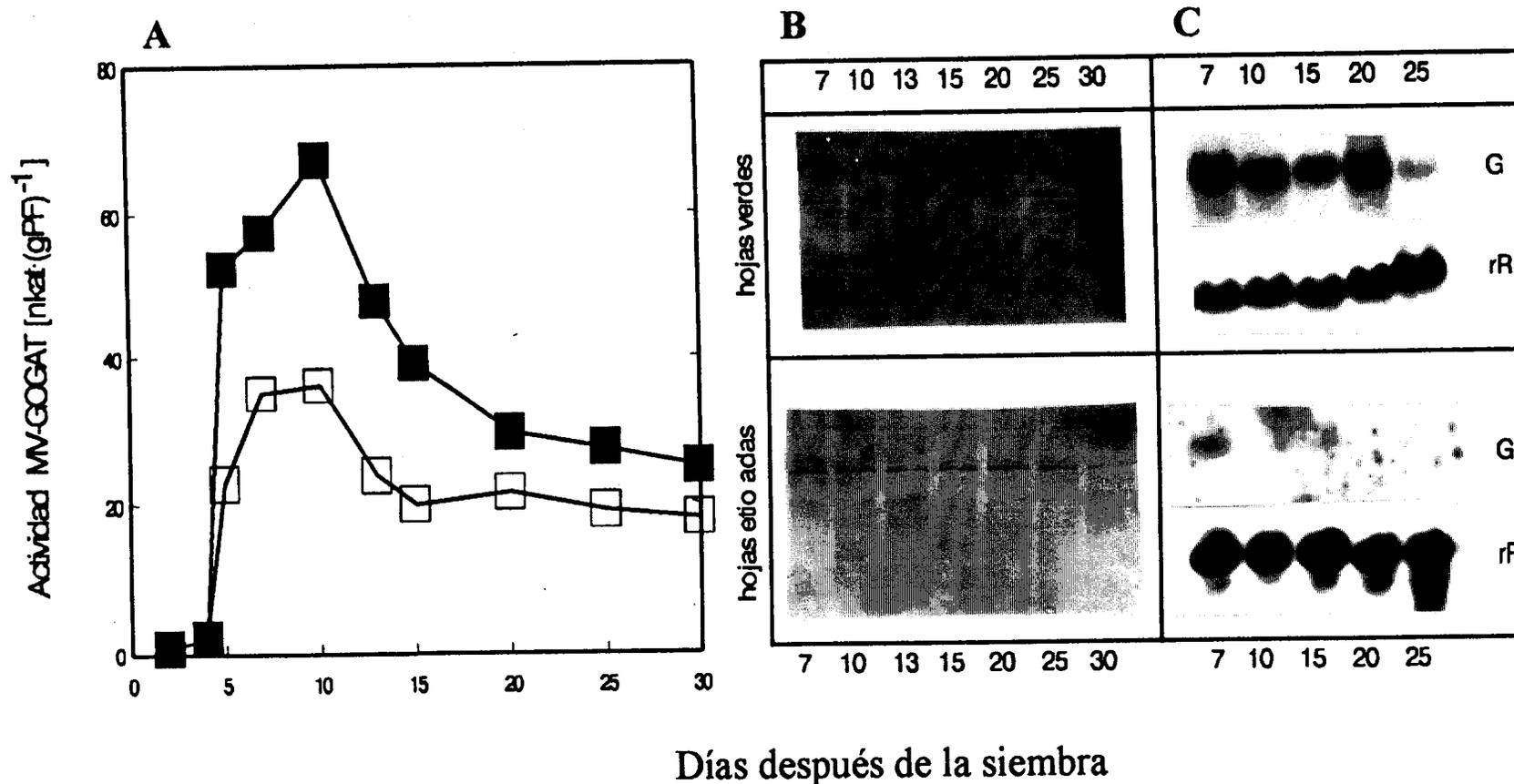


Fig. 16. Evolución de la actividad, proteína y mRNA de la Fd-GOGAT durante el desarrollo de plantas de cebada cultivadas en presencia o ausencia de luz. Los niveles de actividad (A), proteína (B) y mRNA (C) se determinaron en extractos crudos de la primera hoja de las plantas de cebada cultivadas en luz (■-■) o en oscuridad (□-□). Los materiales de las plantas cultivadas en presencia de luz se recogieron en la misma hora del periodo de luz. Para el análisis de la proteína mediante inmunodetección en filtro (B) se separaron mediante electroforesis 200  $\mu$ g de proteína total de los extractos. (C) Para el análisis del mRNA de la Fd-GOGAT mediante Northern blot 40  $\mu$ g de RNA total de las muestras indicadas se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído, y se hibridaron a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT (G). Los filtros fueron también hibridados a la sonda de cDNA del rRNA 18 S (rR).

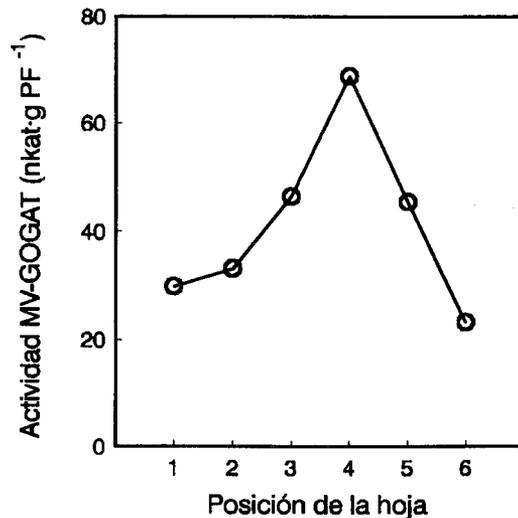


Fig. 17. Niveles de actividad MV-GOGAT en las distintas hojas de plantas de cebada. Las distintas hojas de plantas de cebada de 30 días (1, más basal; 6, hoja superior) se recogieron en distintos grupos y se determinó la actividad MV-GOGAT en los extractos crudos como se describe en *Materiales y Métodos*.

Otra aproximación para confirmar el efecto del desarrollo sobre la expresión de la Fd-GOGAT consistió en determinar el nivel de actividad en las distintas hojas de plantas maduras en un determinado momento del desarrollo. Como puede verse en la Fig. 17, la actividad de la Fd-GOGAT fue máxima en la cuarta hoja, siendo menor en hojas más jóvenes y más maduras. El aumento de la actividad Fd-GOGAT desde la sexta a la cuarta hoja coincidiría con el periodo de expansión, mientras que la disminución de la actividad Fd-GOGAT desde la cuarta hoja a la primera probablemente coincide con el inicio de la senescencia. En arroz se ha observado también un incremento de la actividad y proteína Fd-GOGAT coincidiendo con la expansión de hojas jóvenes, acompañada de una disminución en los niveles de actividad y proteína NADH-GOGAT (Yamaya et al., 1992). Los autores describen una distribución complementaria de la Fd-GOGAT y la NADH-GOGAT antes y después de la expansión de hojas jóvenes, que podría estar relacionada con la implicación de ambas enzimas en distintas funciones. La localización de ambas proteínas en distintos tipos celulares en las hojas de arroz (NADH-GOGAT en las células del metaxilema y metafloema, y la Fd-GOGAT en células del mesófilo) (Hayakawa et al., 1994) apoya la distribución de funciones planteada para ambas enzimas en la misma planta por Yamaya et al. (1992): la NADH-GOGAT estaría implicada en la síntesis de glutamato en hojas antes de la expansión a partir de glutamina que es transportada desde tejidos senescentes, mientras que la Fd-GOGAT cumpliría

esta función cuando las hojas adquieren la capacidad de fotosíntesis. Una distribución temporal similar de las actividades de la Fd-GOGAT y la NADH-GOGAT se ha descrito también durante la germinación de *Phaseolus vulgaris* (León et al., 1990), y durante las primeras etapas del desarrollo en guisante (Matoh y Takahashi, 1982). García-Gutiérrez et al. (1995) han comprobado niveles indetectables de proteína y actividad Fd-GOGAT en embriones de pino, incrementándose el nivel de ambas durante las primeras etapas del desarrollo de las plántulas.

Por otro lado, según Martin et al. (1986) la senescencia en la primera hoja de cebada se inicia en el día 12 después de la siembra. El concepto de senescencia en este trabajo coincide con el definido por Smart (1994) como la secuencia de cambios bioquímicos y fisiológicos que comprenden la última etapa del desarrollo, desde la madurez hasta la muerte. Aunque no se observa deterioro en la primera hoja de cebada en el período comprendido entre los días 12 y 25 después de la siembra, el contenido en clorofila, peso fresco y la tasa de síntesis de proteína han comenzado a disminuir (Martin et al., 1986). La Tabla 3 muestra algunas mediciones efectuadas en nuestras muestras que reflejan que se daba una disminución progresiva del contenido de proteína total en los extractos crudos de la primera hoja de las plantas a partir del día 13 después de la siembra, así como una disminución en el contenido de RNA total extraído de dichos materiales, lo que confirma que la disminución en Fd-GOGAT está relacionada con la puesta en marcha de la senescencia. Smart (1994) ha definido seis categorías de genes relacionados con la senescencia. Uno de los grupos de genes codifican componentes del crecimiento y la asimilación de carbono (proteínas tilacoidales y enzimas del ciclo de Calvin), y muestran máxima expresión durante los primeros estados del desarrollo y hasta la madurez. Es posible que la Fd-GOGAT pertenezca a este grupo de genes, que contribuyen al progreso de la senescencia al reducir su expresión. Durante la senescencia el aparato fotosintético comienza a ser desmantelado y la expresión de genes relacionados con fotosíntesis es reducida (Hensel et al., 1993; Kamachi et al., 1991). En cebada Friedrich y Huffaker (1980) han descrito una pérdida progresiva de la actividad fotosintética desde la madurez. Un aumento del nivel de Fd-GOGAT durante la expansión de la hoja, período en que se inicia la actividad fotosintética y fotorrespiratoria, y una disminución durante la senescencia es consistente con la función principal que se le ha atribuido a esta enzima en la reasimilación del amonio generado en fotorrespiración.

Tabla 3. Evolución del contenido de proteína total soluble y RNA total de la primera hoja de plantas de cebada de creciente edad.

Tiempo (días)	Proteína total (mg·gPF <sup>-1</sup> )	RNA total (mg·gPF <sup>-1</sup> )
5	19,6	N.D. <sup>(a)</sup>
7	18,1	0,712
10	18,0	0,255
13	16,0	0,159
15	15,3	0,095
20	13,1	0,067
25	12,0	0,036
30	11,8	0,037

<sup>(a)</sup> No determinado

La proteína soluble en extractos crudos y el contenido de RNA total se determinaron en la primera hoja de plantas de cebada de creciente edad como se describe en *Materiales y Métodos*.

Son muy escasos los trabajos en los que se haya estudiado la evolución de la Fd-GOGAT con el desarrollo. En *Phaseolus vulgaris* (Streit y Feller, 1982) y en trigo (Cinceroová, 1987) existen algunos datos a nivel de actividad enzimática que indican que la Fd-GOGAT está sometida durante el desarrollo a cambios similares a los descritos para cebada. En *P. vulgaris*, los niveles de actividad de otras enzimas de la asimilación de nitrógeno (NR, NiR y GS) variaban paralelamente al de la Fd-GOGAT. Srivastava et al. (1976) observaron bajos niveles de actividad NR en hojas jóvenes de maíz, cuando hay una alta importación de nutrientes, e incrementaba hasta alcanzar un máximo coincidiendo con el máximo crecimiento de la hoja, disminuyendo en hojas maduras. Bowsher et al. (1991) observaron cambios similares en los niveles de actividad NR y NiR en maíz. En hojas de arroz se ha descrito también una disminución del nivel de Fd-GOGAT y de la GS<sub>2</sub> con el progreso de la senescencia (Kamachi et al., 1991,1992), acompañado de un aumento del nivel de GS<sub>1</sub>. Los autores atribuyen un papel fundamental a la GS<sub>1</sub> en la síntesis de glutamina en los tejidos senescentes para su transporte hacia tejidos en desarrollo, que se comportan como sumideros metabólicos de nitrógeno. La localización de la isoforma citosólica de la GS, así como la expresión específica de su promotor en células del haz vascular es consistente con la función que se le ha atribuido (Kamachi et al., 1992; Edwards et al., 1990; Brears et al., 1991; Carvalho et al., 1992; Pereira et al., 1992). En hojas senescentes de tomate (Pérez-Rodríguez y Valpuesta, 1996) y de *A. thaliana* (Bernhard y Matile, 1994) se han descrito asimismo altos niveles de

expresión de la isoforma citosólica de la GS. Los cloroplastos suponen el más importante orgánulo de reserva de nitrógeno en hojas maduras (Makino y Osmond, 1991), ya que un 50% del nitrógeno del cloroplasto está contenido en la Rubisco, y un 30% en las apoproteínas de los pigmentos de los fotosistemas y los centros colectores de luz (Matile, 1992), de manera que las hojas maduras actúan en la planta como tejidos fuente (“source”) de nitrógeno. La degradación de estas proteínas durante la senescencia resulta en una acumulación de las amidas glutamina y asparragina, que son las formas más comunes en las que se trasloca el nitrógeno dentro de las plantas (Simpson y Dalling, 1981; Kar y Feierabend, 1984; Kamachi et al., 1991).

La disminución de la expresión de la Fd-GOGAT en hojas senescentes de cebada podría estar encaminada a reducir la asimilación en este tejido y a redirigir el nitrógeno hacia los tejidos jóvenes en crecimiento.

#### **4. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA Fd-GOGAT.**

Dado que la Fd-GOGAT es una enzima que utiliza ferredoxina reducida fotosintéticamente como donador de electrones y, teniendo en cuenta su participación en el reciclaje del amonio liberado como producto de la fotorrespiración, se estudió el efecto de la luz sobre la expresión de la enzima mediante distintas aproximaciones: a) analizando el efecto de la luz durante la iluminación (o deetiación) de plantas etioladas, b) estudiando los niveles de expresión de la enzima en las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo, y c) el efecto sobre la Fd-GOGAT de un período prolongado de oscuridad.

##### **4.1. Efecto de la luz sobre la expresión de la Fd-GOGAT durante la iluminación de plantas etioladas.**

Los niveles de actividad enzimática en extractos crudos de hojas de plantas etioladas, verdes y durante la deetiación de las plantas etioladas tras exposición a luz se muestra en la Fig. 18. Durante la iluminación de las plantas etioladas se detectó un incremento en la actividad de la Fd-GOGAT de 2 a 3 veces, alcanzándose los niveles de las plantas verdes de la misma edad. Para ello fueron necesarias 48 horas de luz continua.

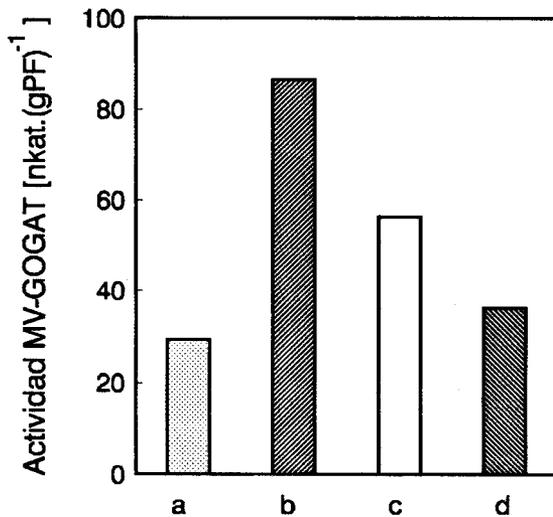


Fig. 18. Niveles de actividad Fd-GOGAT durante la iluminación de plantas etioladas de cebada. La actividad MV-GOGAT fue determinada en extractos crudos de la primera hoja de plantas etioladas de 7 días (a), y tras la transferencia de éstas a luz continua durante 48 horas (b), y en los controles pertinentes de plantas cultivadas en luz (c), así como las plantas etioladas mantenidas en oscuridad otras 48 horas (d).

El análisis de la proteína mediante inmunodetección en filtro muestra que el incremento de actividad Fd-GOGAT en las plantas etioladas expuestas a la luz era acompañado por un incremento en la proteína (Fig. 19 A). El nivel relativo de proteína Fd-GOGAT en el tejido verde, etiolado y en éste último tras exposición a la luz se cuantificó mediante un test de ELISA. Las rectas de calibrado de ELISA de cantidades crecientes de proteína total de los extractos crudos antes mencionados se muestran en la Fig. 19 C. Como control se llevó un calibrado paralelo del extracto crudo de tejido verde del mutante fotorrespiratorio RPr 82/9, que carecía de proteína Fd-GOGAT según se determinó mediante inmunodetección en filtro (ver Apdo. 6). La abundancia relativa de proteína Fd-GOGAT pudo determinarse a partir de las pendientes de las rectas de calibrado de la Fig. 19 C sustrayendo el valor obtenido para el mutante RPr 82/9 (fondo), obteniéndose un incremento en la proteína similar al observado a nivel de actividad enzimática durante la transición a la luz de plantas etioladas (Fig. 18). Estos datos indican que el aumento de la actividad Fd-GOGAT tras la iluminación de plantas etioladas se debe mayoritariamente a la síntesis *de novo* de la enzima y no a la activación de una forma inactiva previamente presente en tejido etiolado.

Los niveles de mRNA de la Fd-GOGAT durante la iluminación de las plantas etioladas se analizaron mediante Northern blot (Fig. 20). Se observó un incremento sustancial del mRNA de la Fd-GOGAT tras la iluminación, mayor que el que se refleja a nivel de proteína. No obstante pensamos que la estimulación de la Fd-GOGAT en plantas etioladas sometidas a la luz obedece también presumiblemente a un control a nivel transcripcional.

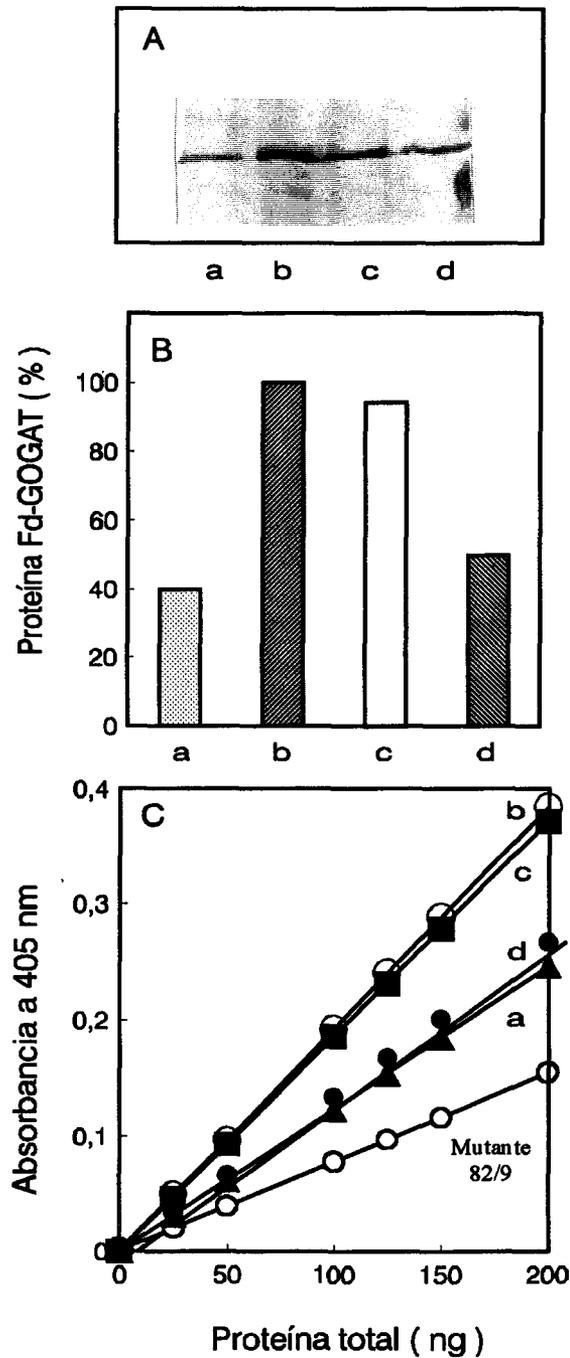
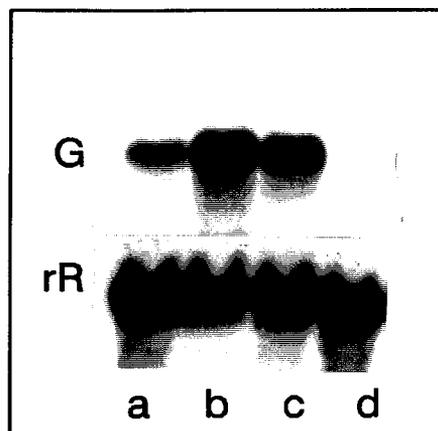


Fig. 19. Nivel de proteína Fd-GOGAT tras la iluminación de plantas etioladas. La abundancia relativa de Fd-GOGAT fue determinada en extractos crudos de los mismos materiales que se indican en la figura anterior, mediante inmunodetección en filtro (200  $\mu$ g de proteína total) (A), o mediante un test de ELISA (B). La figura C muestra las curvas de calibrado de ELISA de Fd-GOGAT en los materiales indicados. Como control de fondo en el ELISA se llevó un calibrado paralelo de un extracto crudo del mutante de Fd-GOGAT RPr 82/9, que carece de proteína Fd-GOGAT (Avila et al., 1993).

Fig. 20. Análisis de los niveles de mRNA de la Fd-GOGAT tras la transferencia a luz de plantas etioladas de cebada. 40  $\mu$ g de RNA total obtenidos a partir de los materiales indicados en las figuras y se sometieron a electroforesis según se refiere en *Materiales y Métodos*. Los filtros fueron hibridados a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT (G) o a la sonda de cDNA del RNA 18 S (rR) como control de carga del RNA total.



Wallsgrave et *al.* (1982) describieron un incremento en la actividad Fd-GOGAT de cebada de 5 veces durante la iluminación de plantas etioladas. En nuestras condiciones, se observó un incremento en la actividad de la Fd-GOGAT de 2 a 3 veces cuando las plantas etioladas se trataban con intensidades de luz entre 100 y 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Sin embargo, como muestra la Fig. 21, a intensidades de luz superiores (400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) similares a las utilizadas por Wallsgrave et *al.*, pudo ser detectado un incremento de hasta 4 veces. La Fig. 21 indica asimismo que eran necesarias al menos 48 horas para alcanzar los niveles de inducción por luz indicados anteriormente, existiendo incrementos de actividad menores a tiempos inferiores. En este período de tiempo, las plantas etioladas sometidas a las intensidades de luz indicadas alcanzaron los niveles de actividad Fd-GOGAT de las plantas verdes cultivadas en las mismas condiciones. En avena, Yu y Woo (1991) han comprobado que la inducción de las actividades de la Rubisco y GS durante la iluminación de plantas etioladas es completada hasta alcanzar los niveles de las hojas verdes al cabo de 48 horas de iluminación.

Aunque en guisante se ha referido un incremento de actividad de la Fd-GOGAT de 10-20 veces durante la transferencia a la luz de plantas etioladas (Matoh y Takahashi, 1981; Wallsgrave et *al.*, 1982), en otras plantas se han descrito niveles de inducción inferiores, similares al que hemos observado en cebada, siendo de 3-5 veces en maíz (Suzuki et *al.*, 1987, 1996), de 3-4 veces en tabaco (Zehnacker et *al.*, 1992), de 7 veces en arroz (Suzuki et *al.*, 1982), y de 3 veces en avena (Yu y Woo, 1991). En otras plantas, como es el caso de *Pinus pinaster*, se han descrito niveles de Fd-GOGAT incluso superiores en plantas etioladas que en plantas verdes (García-Gutiérrez et *al.*, 1995). En este caso, la síntesis de clorofila y la expresión de genes relacionados con fotosíntesis ocurre también en oscuridad.

Sin embargo, Elmlinger y Mohr (1991) describieron en *Pinus silvestris* una inducción de la Fd-GOGAT mediada por fitocromo de 5 veces durante la iluminación de plantas etioladas. En eucariotas fotosintéticos inferiores como algas verdes se ha comprobado también que no hay efecto significativo de la oscuridad sobre los niveles de Fd-GOGAT (Márquez et al., 1986).

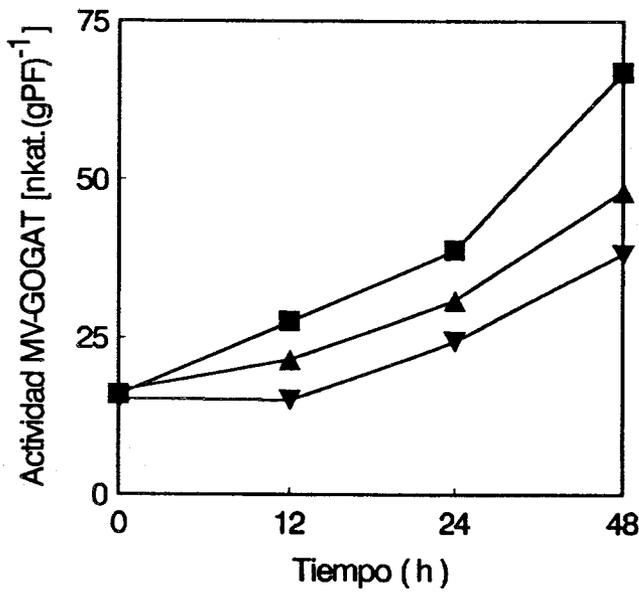


Fig. 21. Evolución de la actividad Fd-GOGAT durante la iluminación de plantas etioladas de cebada a distintas intensidades de luz. Las plantas etioladas de 7 días fueron transferidas durante 48 horas a luz continua de distinta intensidad. La actividad MV-GOGAT fue determinada en los extractos crudos de las hojas de plantas etioladas (tiempo 0) y en extractos crudos de las hojas de plantas transferidas a luz a distintos intervalos de tiempo e intensidades luminosas ( $\nabla$ - $\nabla$  100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\blacksquare$ - $\blacksquare$  400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

En maíz (Sakakibara et al., 1992a), en tabaco (Zehnacker et al., 1992) y en tomate (Becker et al., 1993), al igual que en cebada, se ha observado un mayor nivel de inducción en el mRNA que a nivel de actividad y proteína Fd-GOGAT durante la transición a la luz de plantas etioladas. En el caso de tomate, los autores proponen que tal vez un mecanismo de control post-transcripcional adicional al observado a nivel transcripcional pudiera estar operando para finalmente ajustar los niveles de actividad enzimática. Durante la iluminación de plantas etioladas la capacidad de fotosíntesis y fotorrespiración comienzan a desarrollarse. Yu y Woo (1991) han encontrado en dichas condiciones una correlación entre la aparición de estas actividades y el incremento en las actividades de la GS y la Fd-GOGAT. En los cloroplastos la Fd-GOGAT y la GS2 constituyen un ciclo cooperativo en la asimilación de amonio, y se ha demostrado que ambas enzimas se acumulan coordinadamente en respuesta a la luz (Sakakibara et al., 1992b). En maíz, la acumulación de la GS2 y de la Fd-GOGAT en respuesta a la luz se ha observado específicamente en las células de la vaina, donde, aunque reducida, ocurre la fotorrespiración (Sakakibara et al., 1992b). En cebada hay que resaltar que, aunque la luz provoca una estimulación en la expresión de la Fd-GOGAT, se detectan niveles constitutivos considerables de proteína y actividad enzimática en hojas etioladas.

Para examinar si la luz ejercía un efecto *per se* o si éste era mediado por la disponibilidad de esqueletos carbonados derivados de fotosíntesis durante la iluminación de plantas etioladas, éstas fueron tratadas con distintas fuentes de carbono y mantenidas en oscuridad. La Tabla 4 muestra los valores de actividad Fd-GOGAT y NR en hojas etioladas tratadas bien con glucosa o sacarosa. Ninguna de estas fuentes de carbono tuvo un efecto positivo en la estimulación de la actividad Fd-GOGAT. Sin embargo, la adición de cualquiera de ellas era capaz de inducir de 2 a 3 veces el nivel de actividad NR en las hojas etioladas, como se había descrito anteriormente (Aslam et al., 1976). Esto indica que el efecto de la luz sobre la Fd-GOGAT de cebada durante la iluminación del tejido etiolado se ejerce de manera diferente al descrito para la nitrato reductasa, donde se ha sugerido que la luz actúa de manera indirecta a través del metabolismo del carbono, aunque también lo hace directamente implicando al fitocromo (Daniel-Vedele y Caboche, 1996). Recientemente Lam et al. (1996) han referido la acumulación del mRNA de la Fd-GOGAT en oscuridad y en presencia de sacarosa en *Arabidopsis*. No sabemos si este efecto también se produce a nivel de actividad enzimática, o si en cebada se producirían respuestas similares a las de *Arabidopsis* a nivel de mRNA.

Tabla 4. Efecto de fuentes de carbono orgánico sobre la inducción de la Fd-GOGAT y la NR de hojas de cebada en oscuridad.

Fuente de Carbono	Tiempo (horas)	Actividad MV-GOGAT [nkat·(gPF) <sup>-1</sup> ]	Actividad NR [pkat·(gPF) <sup>-1</sup> ]
sacarosa	0	22,7	308,4
“	3	19,0	N.D. <sup>a</sup>
“	6	21,3	N.D.
“	12	17,7	628,5
glucosa	0	22,7	308,4
“	3	19,5	638,5
“	6	17,5	N.D.
“	12	19,8	750,2

<sup>a</sup> N.D. = no determinado

Las hojas de plantas etioladas de 7 días fueron cortadas y se sumergieron por la base en solución 60 mM de sacarosa ó 50 mM de glucosa, manteniéndose en oscuridad. A distintos tiempos se tomaron grupos de hojas, se cortó la base, se enjuagaron con agua destilada y se determinó la actividad MV-GOGAT y NR en los extractos crudos.

## 4.2. Expresión de la Fd-GOGAT durante el fotoperiodo.

Otra aproximación para estudiar el efecto de la luz sobre la Fd-GOGAT consistió en examinar la expresión de la enzima en distintos momentos de las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo. Como puede verse en la Fig. 22 A, la actividad enzimática se mantuvo prácticamente constante en un ciclo diario de 12h de luz/12h de oscuridad alternantes. Los niveles relativos de proteína Fd-GOGAT en las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo se determinaron mediante ELISA (Fig. 22 B), obteniéndose asimismo unos niveles constantes durante todo el fotoperiodo. El análisis del mRNA de la Fd-GOGAT mediante Northern blot que se muestra en la Fig. 22 C refleja una situación similar a la observada a nivel de proteína y actividad enzimática. Estos resultados eran aparentemente contradictorios con los anteriores que indicaban que la Fd-GOGAT es estimulada por la luz durante la iluminación de plantas etioladas. El efecto de la luz sobre la expresión de la Fd-GOGAT no se traduce en cambios en los niveles de expresión durante las transiciones de luz/oscuridad del fotoperiodo.

Otros estudios sobre el efecto del fotoperiodo sobre la Fd-GOGAT han sido desarrollados en girasol, y confirman asimismo niveles similares de actividad Fd-GOGAT en las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo (Fernández-Conde et al., 1995). Los autores han comprobado además que la actividad Fd-GOGAT está sujeta a una ritmicidad endógena ultradiana. En el caso de cebada, si existen, son de poca significación.

En otras enzimas de la asimilación de nitrógeno se ha comprobado que la luz ejerce un mayor control sobre la expresión, y que ésta opera además a distintos niveles: el contenido de los transcritos de la NR y NiR disminuyen en oscuridad, y son inducidos cuando las plantas verdes adaptadas a oscuridad o plantas etioladas son expuestas a la luz (Daniel-Vedele y Caboche, 1996). En el caso de la NR esta regulación por luz se ejerce a nivel transcripcional, directamente implicando al fitocromo o bien indirectamente a través del metabolismo del carbono. Además de la regulación por luz de la NR a nivel transcripcional, existen mecanismos adicionales de control a nivel post-transcripcional (Daniel-Vedele y Caboche, 1996). En el caso de la NiR también se han descrito cambios en los niveles de expresión en respuesta a la luz, tanto durante la iluminación de plantas etioladas como en las transiciones de luz/oscuridad del fotoperiodo (Small y Gray, 1984; Gupta y Beevers, 1984; Schuster y Mohr, 1990; Seith et al., 1991).

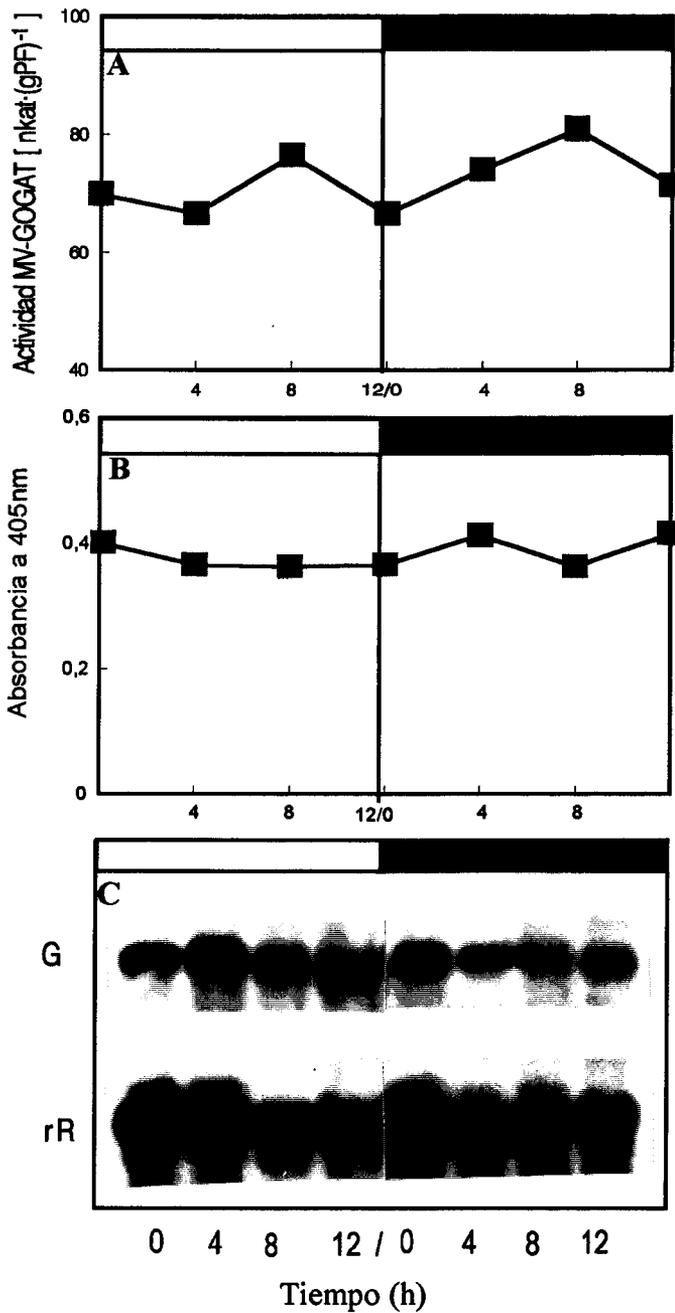
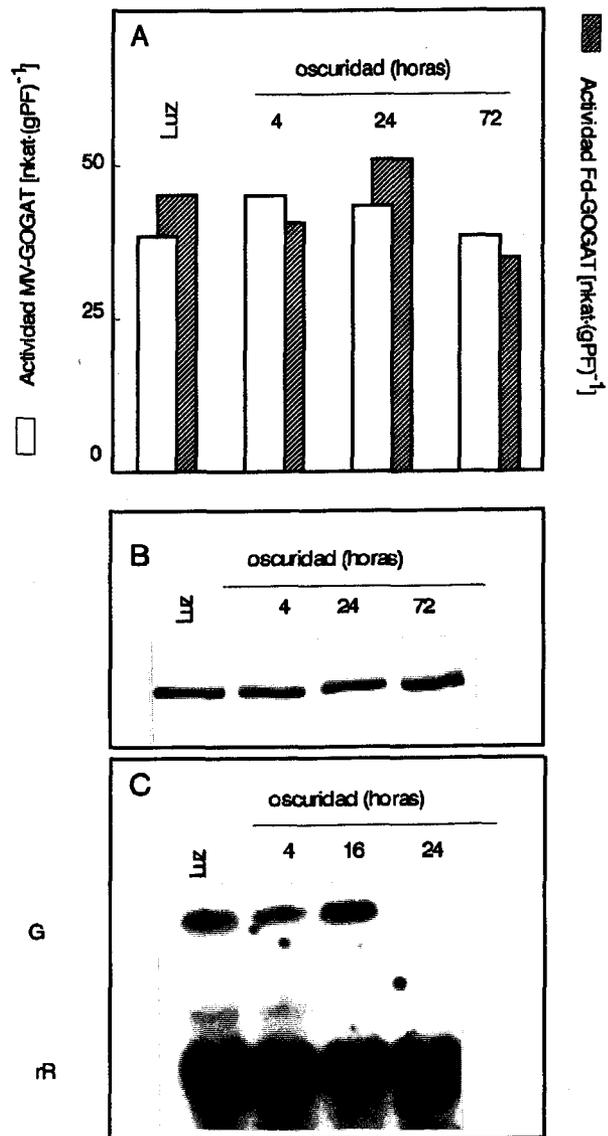


Fig. 22. Evolución de la actividad, proteína y mRNA de la Fd-GOGAT durante el fotoperiodo. Las plantas de cebada se cultivaron bajo un ritmo de 12 h luz/12 h oscuridad durante 15 días. En este punto se tomaron grupos de todas las hojas de las plantas a distintos tiempos del fotoperiodo, y se determinó la actividad MV-GOGAT en los extractos crudos (A). El nivel relativo de proteína Fd-GOGAT de los materiales indicados se analizó mediante un test de ELISA. El gráfico B muestra los incrementos de absorbancia a 405 nm en los extractos de dichos materiales y el extracto del mutante RPr 82/9, que carece de proteína Fd-GOGAT (Avila et al., 1993) a partir de 150 ng de proteína total de los extractos. El contenido de mRNA de la Fd-GOGAT en los materiales se determinó mediante Northern blot a partir de 20 µg de RNA total (C), hibridándose a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT (G). Como control de carga de RNA total el mismo filtro se hibridó a la sonda de cDNA del rRNA 18 S (rR).

### 4.3. Expresión de la Fd-GOGAT tras un período de oscuridad prolongada.

Dado que no se observaba efecto de la oscuridad sobre la Fd-GOGAT en las 12 horas de la fase de oscuridad del fotoperiodo, se analizó el efecto de periodos de oscuridad más largos sobre los niveles de expresión de la Fd-GOGAT de plantas verdes. Como muestra la Fig. 23 (A y B), los niveles de actividad enzimática y proteína, determinados mediante inmunodetección en filtro, se mantuvieron sorprendentemente inalterados después de transferir las plantas verdes a oscuridad continua durante 72 horas. Es interesante resaltar que esto ocurría tanto para la actividad enzimática dependiente de ferredoxina como de metil viológeno. El nivel del transcrito de la Fd-GOGAT examinado mediante Northern blot se mantuvo asimismo estable durante las primeras 16 horas de oscuridad, pero dejó de ser detectable a las 24 horas de oscuridad continua (Fig. 23 C).



Estos resultados indican que el efecto de la oscuridad sobre la expresión de la Fd-GOGAT: a) no se ejerce de manera inmediata, y b) se produce en principio sólo a nivel de mRNA, manteniéndose constantes los niveles de proteína y actividad enzimática hasta las 72 horas a pesar de no detectarse el mRNA después de 24 horas de oscuridad continua. Esto a su vez indica una gran estabilidad de la proteína *in vivo*.

Cuando las plantas sometidas a oscuridad fueron transferidas de nuevo a un ciclo normal de luz/oscuridad, el mRNA de la Fd-GOGAT volvió a ser detectado en Northern blot al cabo de 12 horas de luz, manteniéndose a niveles constantes durante el nuevo ciclo restaurado (Fig. 24).

No existen estudios sobre el efecto de la oscuridad prolongada sobre la Fd-GOGAT con los que podamos contrastar nuestros resultados. En pino, se ha comprobado que los niveles de mRNA y proteína Fd-GOGAT se mantienen a los mismos niveles tanto en plantas cultivadas en oscuridad como en presencia de luz. En este trabajo además los autores describen la expresión en oscuridad de genes relacionados con fotosíntesis (García-Gutiérrez et *al.*, 1995).

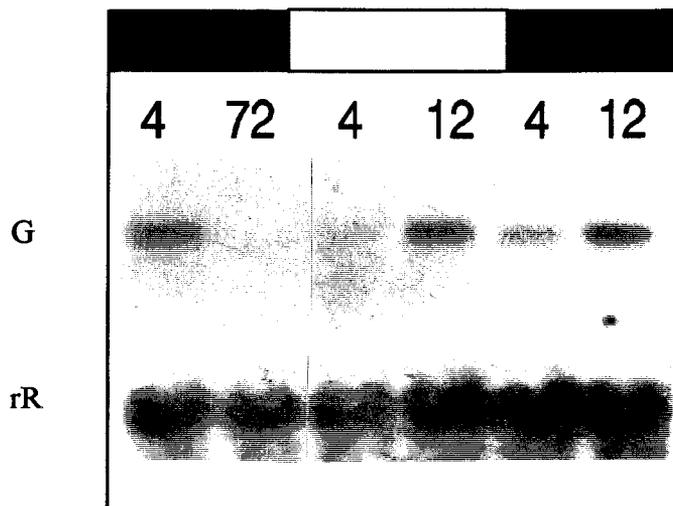


Fig. 24. Efecto de la restauración del fotoperiodo sobre la Fd-GOGAT de plantas sometidas a un período de oscuridad prolongada. Las plantas de 15 días cultivadas bajo un ritmo de 12h luz / 12h oscuridad fueron sometidas a oscuridad durante 72 horas. En este punto, fueron nuevamente transferidas a un nuevo ciclo restaurado. 30  $\mu$ g de RNA total de estos materiales se analizaron mediante Northern blot, hibridándose a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT.

Los resultados anteriores en conjunto indican que el efecto de la luz sobre la Fd-GOGAT de cebada donde mejor y más rápidamente se aprecia es durante la iluminación del tejido etiolado. Los niveles sustanciales de actividad Fd-GOGAT en el tejido etiolado así como en el tejido verde adaptado a oscuridad sugieren que la luz *per se* no es un requisito indispensable en la regulación de la expresión de la Fd-GOGAT. Pensamos que la respuesta de la Fd-GOGAT durante la iluminación del tejido etiolado podría formar más bien parte de una respuesta general de dicho tejido a la luz, que implica el desarrollo del aparato fotosintético y una transición hacia la autotrofia. Otros autores han resaltado que hay que tomar con cautela los efectos que se observan tras la iluminación del tejido etiolado para no hacer extrapolaciones erróneas (Emes y Tobin, 1993). No obstante hay que mencionar que la mayor parte de los estudios que describen la inducibilidad de la Fd-GOGAT por luz, al igual que otros muchos sistemas, usan solamente la deetiología como sistema experimental de trabajo.

## **5. EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA Fd-GOGAT.**

En la Fig. 25 A se comparan los niveles de actividad de la Fd-GOGAT en plantas verdes y etioladas cultivadas bien con nitrato como única fuente de nitrógeno, o desprovistas de nitrógeno exógeno. Los valores de actividad enzimática en plantas verdes crecidas en presencia de nitrato fueron aproximadamente 2 veces superiores a los de plantas verdes en ausencia de nitrógeno exógeno. Sin embargo, en plantas etioladas hubo poca variación en los niveles de actividad enzimática independientemente de que las plantas crecieran en presencia o ausencia de nitrato exógeno. Tampoco varió sustancialmente el nivel de actividad enzimática en plantas etioladas independientemente de que se cultivaran en nitrato o amonio. (Tabla 5).

A nivel de proteína, analizada mediante inmunodetección en filtro, se obtuvieron resultados similares a los observados a nivel de actividad (Fig. 25 B). En el tejido verde pudo detectarse el mayor nivel de proteína Fd-GOGAT en presencia de nitrógeno exógeno.

El análisis mediante Northern blot en la Fig. 25 C muestra que el nitrato producía un gran efecto estimulador al nivel del mRNA de la Fd-GOGAT, mayor que el observado a nivel de actividad enzimática y proteína. Sin embargo, este efecto sólo se detectó en las plantas que crecieron en presencia de luz y no en el tejido etiolado. Estos resultados indican que el efecto inductor del nitrato sobre la Fd-GOGAT sólo se ejerce en presencia de

luz, de manera que se alcanzan los niveles máximos de expresión con la acción conjunta del nitrato y de la luz.

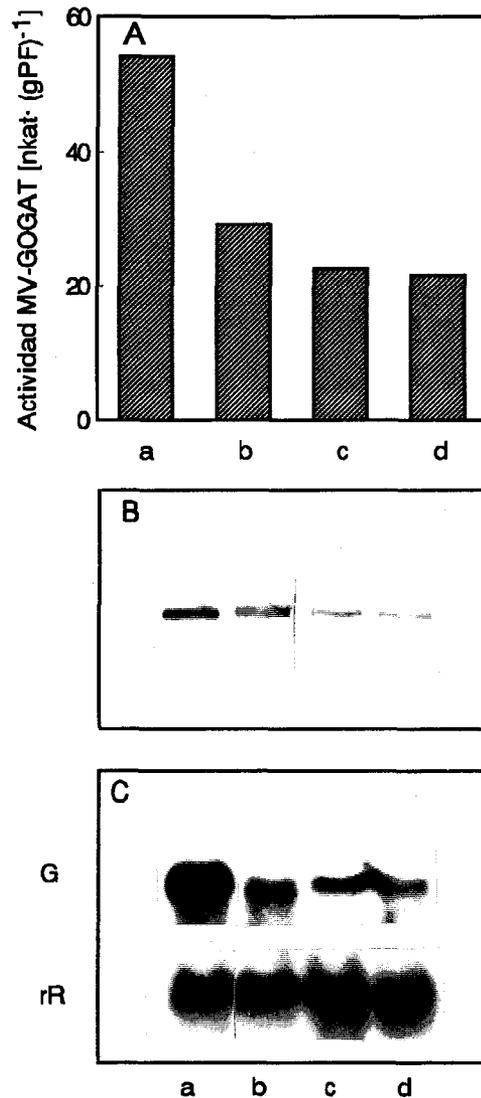


Fig. 25. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la Fd-GOGAT de cebada. Se cultivaron plantas de cebada durante 7 días en luz y 20 mM KNO<sub>3</sub> (a), en luz sin nitrógeno exógeno (b), en oscuridad con 20 mM KNO<sub>3</sub> (c), y en oscuridad sin nitrógeno exógeno (d). La actividad MV-GOGAT fue determinada en los extractos crudos de la primera hoja de las plantas cultivadas en cada condición (A). La proteína Fd-GOGAT fue analizada en los extractos anteriores mediante inmunodetección en filtro (200 µg de proteína total) (B). El mRNA de la Fd-GOGAT en los mismos materiales fue analizado mediante Northern blot a partir de 30 µg de RNA total, hibridándose a la sonda de cDNA de la Fd-GOGAT. Como control de carga el filtro fue hibridado a la sonda de cDNA del rRNA 18 S (rR).

Tabla 5. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad de la Fd-GOGAT en plantas etioladas.

Condiciones de cultivo	Actividad MV-GOGAT [nkat.(gPF) <sup>-1</sup> ]
-N	20,4 – 21,6
+ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24,9 - 26,6
+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	23,1

La actividad MV-GOGAT fue determinada en los extractos crudos de la primera hoja de plantas etioladas de cebada cultivadas en la solución de nutrientes carente de nitrógeno, o suplementada con nitrato o amonio 20 mM.

Suzuki et al. (1996) han reportado que en hojas de maíz se produce una situación similar a la que hemos descrito para hojas de cebada: los niveles de la Fd-GOGAT y su mRNA incrementan de 3 a 5 veces al exponer el tejido etiolado a la luz en presencia de nitrato o amonio como fuentes de nitrógeno exógeno. Sin embargo, no hay efecto inductor de cualquiera de estas fuentes de nitrógeno cuando las plantas son mantenidas en oscuridad. La luz en ausencia de nitrógeno exógeno tampoco es suficiente para inducir los niveles de expresión de la Fd-GOGAT. En un trabajo anterior en la misma planta, Sakakibara et al. (1992b) describieron un leve efecto inductor del nitrato exógeno sobre la Fd-GOGAT, y mayor sobre la GS<sub>2</sub> específico en células del mesófilo, donde se localizan el resto de las enzimas implicadas en la asimilación de nitrato. En las células de la vaina, donde ocurre la fotorrespiración, aunque reducida, en plantas C<sub>4</sub>, la expresión de la Fd-GOGAT y de la GS<sub>2</sub> es regulada por luz de una manera coordinada, pero no responde al nitrógeno exógeno. Los autores han propuesto que la distinta regulación de ambas enzimas en cada tipo de célula podría estar relacionada con una distinta función del ciclo GS/GOGAT en cada una de ellas.

Sobre el efecto del nitrógeno exógeno en la expresión de la Fd-GOGAT en raíces se han aportado datos contradictorios: Redinbaugh y Campbell (1993) han descrito la inducción rápida, transitoria e independiente de la síntesis de proteína, de la Fd-GOGAT y la GS<sub>2</sub> en respuesta al nitrato en raíces de maíz, mientras que Sakakibara et al. (1992b) indicaron la ausencia de un efecto estimulador del nitrato sobre la Fd-GOGAT en raíces de la misma planta. En otras plantas también se han referido distintas respuestas de la Fd-GOGAT al nitrógeno exógeno. En cultivos de células de arroz en suspensión se ha descrito la acumulación del mRNA de la Fd-GOGAT en respuesta al nitrato exógeno, pero no al amonio, glutamina o glutamato, aunque cualquiera de estas fuentes inducen significativamente los niveles de

mRNA y proteína NADH-GOGAT (Watanabe et al., 1996). En coleoptilos de arroz en anaerobiosis el mRNA de la Fd-GOGAT es estimulado de manera rápida y transitoria, en un mayor grado que la proteína y la actividad, por nitrato (Mattana et al., 1996). En hojas de tabaco la carencia de nitrato reduce completamente los niveles de mRNA y actividad de la NR y NiR. Sin embargo, esta situación sólo produce una disminución limitada en el mRNA y la actividad de la GS2 y la Fd-GOGAT. Cuando las plantas son transferidas de nuevo a un medio con fuente de nitrógeno, se produce una inducción específica de la NR y NiR por nitrato. Sin embargo, diferentes fuentes de nitrógeno son capaces de restaurar los niveles de mRNA y actividad de la GS2 y la Fd-GOGAT (Migge y Becker, 1996). Los autores proponen que más que un efecto específico del nitrógeno sobre la expresión de la GS2 y la Fd-GOGAT, la respuesta de éstas a la privación de nitrógeno más bien parece reflejar la reducción general en la actividad metabólica que supone el estrés de nitrógeno.

En hojas de cebada hemos mostrado en este trabajo que hay un considerable nivel de proteína y actividad Fd-GOGAT en el tejido sometido a carencia de nitrógeno exógeno, lo cual indica que éste no es un requisito indispensable en la expresión de la Fd-GOGAT. El hecho de que exista una expresión constitutiva en ausencia de nitrógeno puede ser ventajoso para la reasimilación del amonio de fotorrespiración cuando las plantas crecen sin nitrógeno (Migge y Becker, 1996). Los máximos niveles de expresión se consiguen con la acción conjunta de la luz y el nitrato, condiciones en que el ciclo GS/GOGAT trabaja en la asimilación de amonio procedente de la reducción de nitrato, y mayoritariamente en el reciclaje de amonio fotorrespiratorio.

## **6. EXPRESIÓN DE LA Fd-GOGAT EN MUTANTES FOTORRESPIRATORIOS DE CEBADA.**

En cebada se han aislado una colección de mutantes fotorrespiratorios, algunos de los cuales son deficientes en actividad Fd-GOGAT, y que fueron identificados siguiendo el mismo método de selección propuesto por Somerville y Ogren (1979) para *Arabidopsis* (Kendall et al., 1986; Blackwell et al., 1988b). Estos mutantes presentan menos de un 5% de la actividad Fd-GOGAT del tipo silvestre tanto en hojas como en raíces (Kendall et al., 1986). Sin embargo, el nivel de actividad NADH-GOGAT está presente a los mismos niveles que en el tipo silvestre (Kendall et al., 1986). Dichos mutantes sólo son viables en atmósfera de alta concentración de CO<sub>2</sub>,

condición en que la fotorrespiración es reducida. En estas condiciones se ha descrito que el ciclo GS<sub>1</sub>/NADH-GOGAT sería suficiente para responder de la asimilación de amonio procedente de la asimilación primaria de nitrato (Kendall et al., 1986). Sin embargo, al ser transferidos a aire muestran fuertes síntomas de estrés, al ser incapaces de reciclar el amonio perdido en fotorrespiración. En estas condiciones, los mutantes deficientes en actividad Fd-GOGAT acumulan altos niveles de glutamina, mientras que el contenido de otros aminoácidos como serina, aspartato, glutamato y alanina es fuertemente reducido, reflejando la incapacidad de estos mutantes de sintetizar glutamato (Kendall et al., 1986). La incapacidad de reasimilar el amonio producido en fotorrespiración inhibe la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> (Blackwell et al., 1987, 1988; Sivak et al., 1988). Aunque se han propuesto hipótesis para explicar esta caída en la fijación de CO<sub>2</sub> en los mutantes, el mecanismo no es todavía claro, aunque no parece que sea debido a un efecto tóxico del amonio acumulado (Lea y Forde, 1994).

El aislamiento de mutantes deficientes en GS<sub>2</sub> en cebada (Blackwell et al., 1987; Wallsgrove et al., 1987) y en Fd-GOGAT, primeramente en *A. thaliana* (Somerville y Ogren, 1980) y posteriormente en cebada (Kendall et al., 1986; Blackwell et al., 1988b) y guisante (Lea et al., 1992) ha resultado de gran importancia para determinar el papel esencial de ambas enzimas en la reasimilación de amonio fotorrespiratorio, que excede 10 veces a la asimilación primaria de amonio (Keys et al., 1978).

En este trabajo hemos hecho uso de los anticuerpos específicos obtenidos frente a la Fd-GOGAT de hojas de cebada (Márquez et al., 1988), así como el clon de cDNA para esta enzima también de cebada (Avila et al., 1993) para analizar la expresión a nivel de proteína y mRNA de la Fd-GOGAT en algunos de los mutantes fotorrespiratorios deficientes en la actividad enzimática con el fin de determinar las posibles lesiones que afectan a estos mutantes.

El análisis de la proteína en extractos crudos de hojas de cuatro de las estirpes mutantes y del tipo silvestre mediante inmunodetección en filtro se muestra en la Fig. 26. Tres de las estirpes mutantes, RPr 82/1, RPr 82/9 y RPr 84/82, contenían niveles indetectables de proteína Fd-GOGAT, mientras que el mutante RPr 84/42 presentaba una cantidad detectable, aunque considerablemente reducida en comparación con el tipo silvestre. Como control, el nivel de proteína Fd-GOGAT fue también analizado en dos mutantes fotorrespiratorios alterados en las actividades GS<sub>2</sub> (RPr 83/32) y PGP (RPr 84/90), determinándose niveles de proteína ligeramente inferiores a los del tipo silvestre. La proteína total de los extractos de los mutantes y del tipo silvestre analizada mediante tinción con Azul de Coomassie en gel

reveló un mismo patrón de proteínas en los mutantes y en el silvestre, siendo detectable la proteína Fd-GOGAT sólo en el extracto del tipo silvestre (Fig. 27). Este resultado confirmó que la falta de reacción de los anticuerpos con los extractos de los mutantes mediante inmunodetección se debía a la ausencia real de la proteína y no a una alteración en las propiedades inmunológicas de la proteína.

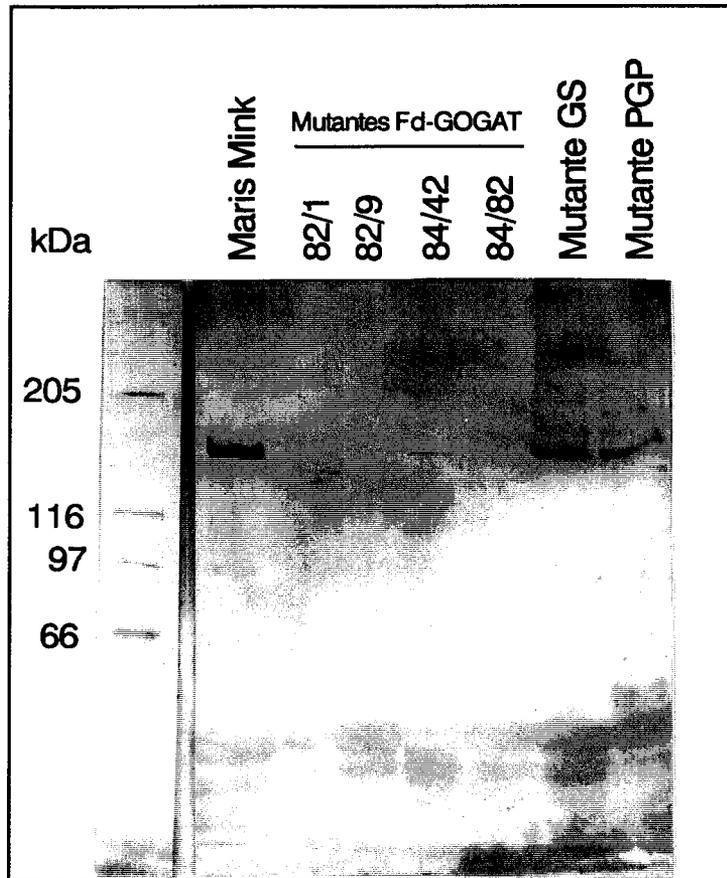


Fig. 26. Análisis de la proteína Fd-GOGAT en mutantes fotorrespiratorios de cebada. 200  $\mu$ g de proteína total de extractos crudos de hojas de la estirpe silvestre y cuatro estirpes mutantes deficientes en actividad Fd-GOGAT, así como de un mutante de GS<sub>2</sub> y de PGP se analizaron mediante inmunodetección en filtro con los anticuerpos anti-Fd-GOGAT de cebada.

El nivel de mRNA de la Fd-GOGAT en los mutantes y en el tipo silvestre se analizó mediante Northern blot. Como puede verse en la Fig. 28, de los cuatro mutantes, las líneas RPr 82/9 y RPr 84/82 mostraron la misma abundancia del mRNA de 5,7 kb que el tipo silvestre. Los mutantes RPr 82/1 y RPr 84/42 presentaron especies de RNA de distinto tamaño que el tipo silvestre: los tamaños de estos mRNA, estimados a partir de los mRNA patrones, fueron de 5,9 y de 5,3 kb en el mutante RPr 82/1, y de 6,0 y 4,1 en el mutante RPr 84/42.

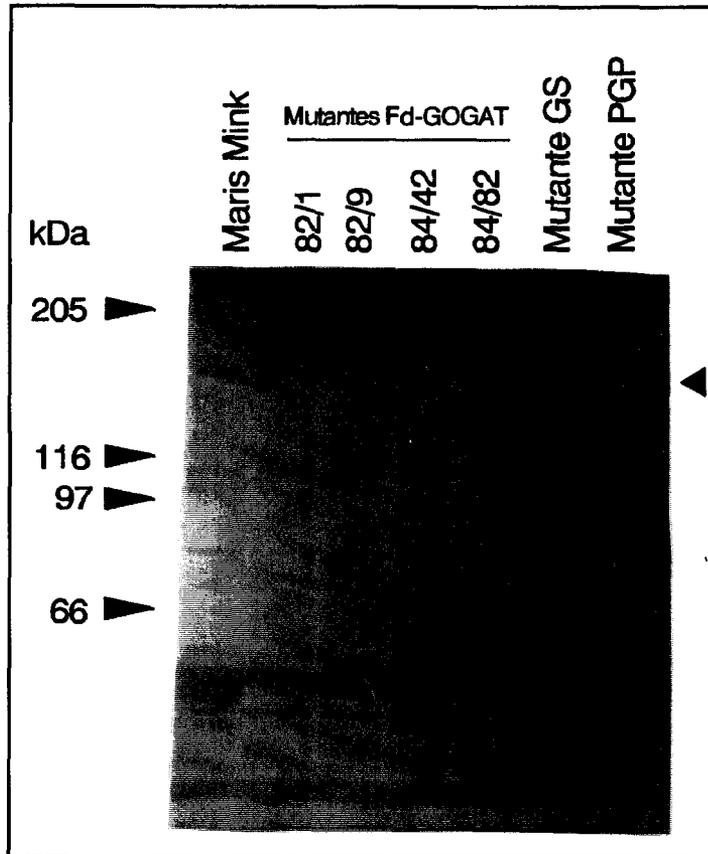


Fig. 27. Análisis de la proteína total en extractos crudos de hojas de la línea silvestre y varias líneas mutantes fotorrespiratorias de cebada. 200  $\mu$ g de proteína total de los extractos crudos de hojas de las estirpes indicadas en la figura anterior se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y la proteína total fue analizada mediante tinción del gel con Azul de Coomassie.

Freeman et al. (1990) clasificaron los mutantes de cebada deficientes en  $GS_2$  en tres grupos distintos: clase I, deficientes en mRNA y proteína; clase II, con niveles normales de mRNA pero niveles indetectables de proteína; y clase III, con niveles normales de mRNA y proteína, pero sin actividad enzimática (Tabla 6). Según esta clasificación, los mutantes de Fd-GOGAT RPr 82/9 y RPr 84/82 pertenecerían al grupo II. La traducción del mRNA de estos mutantes podría resultar en un precursor de la Fd-GOGAT que por alguna razón podría ser inestable y degradarse, como ha señalado Freeman et al. (1990) para mutantes de  $GS_2$  pertenecientes a la misma clase. Estos mutantes estarían, por tanto, afectados a nivel post-traducciona. Por otra parte, los mutantes de Fd-GOGAT RPr82/1 y RPr 84/42 resultaron ser diferentes de cualquiera de los mutantes de  $GS_2$ , y pertenecerían a un nuevo grupo de mutantes, clase IV, en que el mRNA de la Fd-GOGAT es reemplazado por especies de mRNA de distinto tamaño (Tabla 6). Estos mutantes podrían estar alterados en el comienzo o final de la transcripción, o

bien en el proceso de maduración de los transcritos primarios.

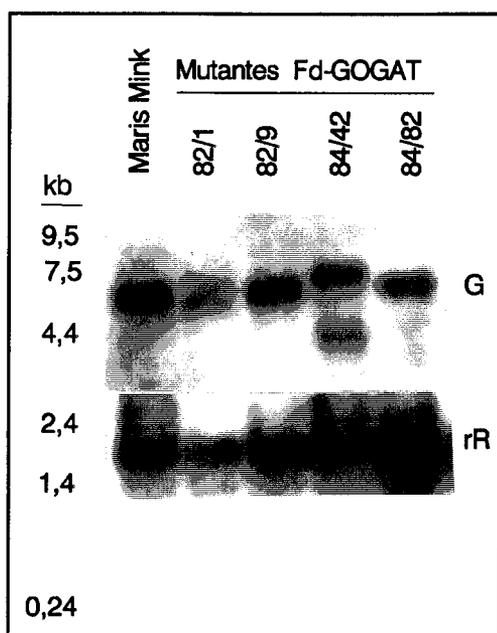


Fig. 28. Análisis del mRNA de la Fd-GOGAT en el tipo silvestre y mutantes de Fd-GOGAT. 30 µg de RNA total de hojas de la línea silvestre y de cuatro líneas mutantes deficientes en actividad Fd-GOGAT fueron analizados mediante Northern blot. Los filtros fueron hibridados a la sonda de cDNA de Fd-GOGAT (G), y como control de carga del RNA total, fueron hibridados a la sonda de cDNA del rRNA 18 S (rR)

Tabla 6. Clasificación de los mutantes fotorrespiratorios de cebada deficientes en GS<sub>2</sub> y Fd-GOGAT.

Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
GS RPr 84/34 <sup>(a)</sup> GS RPr 84/50 <sup>(a)</sup> GS RPr 84/84 <sup>(a)</sup> GS RPr 84/83 <sup>(a)</sup>	GS RPr 83/31 <sup>(a)</sup> GOGAT RPr 82/9 GOGATRPr 84/82	GS RPr 83/20 <sup>(a)</sup> GS RPr 83/32 <sup>(a)</sup> GS RPr 84/12 <sup>(a)</sup>	GOGAT RPr 82/1 GOGAT RPr 84/42
<i>mRNA</i> -	+	+	+ (alterado)
<i>Proteína</i> -	-	+	-/+
<i>Actividad</i> -	-	-	-
<i>Lesión</i>			
Transcripcional	Post-traducciona	Post-traducciona	Inicio/terminación
Post-transcripcional	(procesamiento	(catálisis)	transcripción
(estabilidad mRNA)	proteína)		Post-transcripcional
	Traducciona?		(procesamiento
			mRNA)

La tabla muestra la clasificación de los mutantes fotorrespiratorios de cebada en base a las posibles lesiones que afectan la expresión de las enzimas señaladas. La procedencia de los datos se muestra como (a) Freeman et al., 1990.

## **7. DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS ESTUDIOS DE REGULACIÓN DE LA Fd-GOGAT EN CEBADA.**

De los distintos factores examinados se ha comprobado que la luz, el nitrógeno, la diferenciación de órganos y el desarrollo afectan a los niveles de expresión de la Fd-GOGAT. Los niveles considerables de actividad enzimática y proteína, así como su estabilidad, en el tejido etiolado, en el tejido verde adaptado a oscuridad o sometido a carencia de nitrógeno indican que éstos no son requisitos indispensables para la expresión de la Fd-GOGAT en cebada. Los mecanismos de regulación parecen operar fundamentalmente a nivel transcripcional, aunque también se han encontrado indicios de que procesos post-transcripcionales puedan ser de importancia en la regulación de la expresión de la Fd-GOGAT de cebada: a) Las respuestas a los diferentes estímulos son más marcadas a nivel de mRNA que a nivel de actividad enzimática y proteína; b) En la Fig. 16 podría interpretarse que la disminución de actividad enzimática a partir del máximo alcanzado en el día 10 después de la siembra precede a la disminución observada en los niveles de proteína y mRNA; c) El análisis de los mutantes fotorrespiratorios deficientes en Fd-GOGAT indica que los procesos a nivel post-transcripcional son muy importantes en el control de la actividad Fd-GOGAT.

***RESULTADOS Y DISCUSION II.  
EXPRESION DE LA NADH-NITRATO  
REDUCTASA DE Lotus japonicus***

## 1. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE *Lotus japonicus*.

Para los estudios de expresión de la NR en *L. japonicus* era necesario disponer de anticuerpos específicos con el fin de analizar la expresión a nivel de proteína. Con este propósito, en primer lugar se intentó la purificación de la enzima de raíces, con el fin de obtener anticuerpos policlonales. La Fig. 29 muestra el perfil de elución de la actividad NR parcialmente purificada en condiciones similares a las descritas por Márquez *et al.*, (1982), mediante el procedimiento descrito en el Apdo. 6.1. de *Materiales y Métodos*. Cuando las fracciones con actividad NR fueron agrupadas, y una parte alícuota sometida a electroforesis en condiciones desnaturizantes no pudo detectarse la proteína del tamaño correspondiente a la NR en los geles. Estos resultados indicaban que, a pesar de tener buena actividad enzimática, el rendimiento en las purificaciones en términos de proteína NR producida era muy bajo, lo cual podía suponer un problema de tiempo y esfuerzo a la hora de recuperar cantidad suficiente de la proteína pura para la obtención de los anticuerpos.

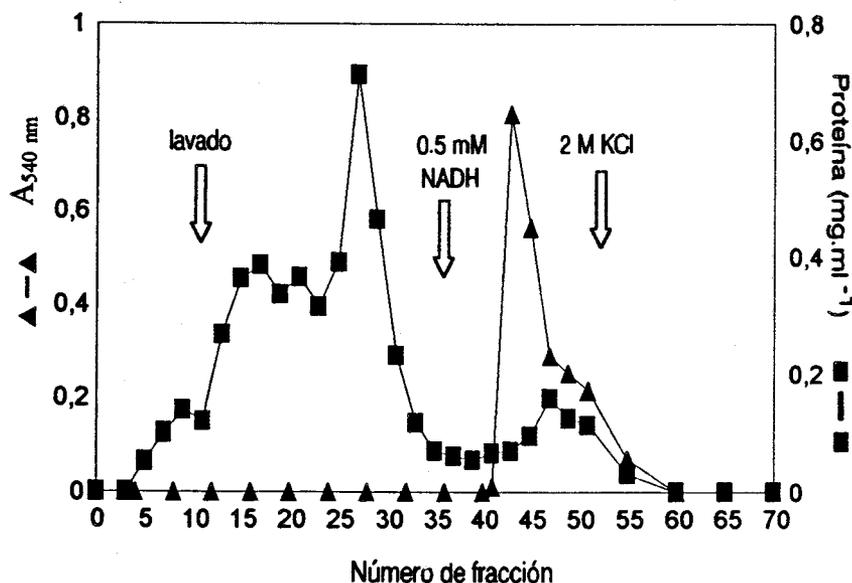


Fig. 29. Purificación parcial de la NR de raíces de *L. japonicus* mediante cromatografía de afinidad en Azul dextrano Sefarosa. 12 ml de un extracto crudo de raíces de *L. japonicus*, procedentes de 4 g de material, en el tampón descrito en *Materiales y Métodos*, fueron aplicados a la columna ( $\varnothing$  1 cm x h 10 cm) a un flujo de  $10 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ . La columna fue lavada con 15 ml del mismo tampón hasta la elución completa de la proteína no adsorbida. La elución de la NR se llevó a cabo en el mismo tampón suplementado con 0,5 mM de NADH. Se muestra la  $A_{540 \text{ nm}}$  de los ensayos de actividad enzimática efectuados para partes alícuotas 0,1 ml de cada fracción de 1 ml, así como la proteína total presente en cada fracción determinada por el método de Bradford.

Otra alternativa consistió en el uso de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la enzima de espinaca (cedidos por el Dr. Ian Prosser, IACR-Long Ashton, Bristol, U.K.), y anticuerpos dirigidos frente a un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 309-327 de la NR de tabaco (cedidos por el Dr. Mark Stitt, Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Alemania), comprobándose su incapacidad de reaccionar mediante inmunodetección en filtro con la NR de *L. japonicus* en extractos crudos de raíces, o los precipitados del 0-40% de sulfato amónico obtenidos a partir de éstos.

Finalmente, la secuencia del gen para la NR de *Lotus japonicus* estuvo disponible (trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Clarkson, número de acceso en bases de datos: X80670). Merced a dicha secuencia se obtuvieron anticuerpos específicos contra tres péptidos de la proteína, con buenas características de hidrofiliidad y flexibilidad. Cada péptido fue inyectado a dos conejos, obteniéndose así 6 antisueros. La Tabla 7 muestra la secuencia de estos péptidos y el dominio de la proteína en el que están localizados.

Tabla 7. Secuencia de los péptidos de la NR de *L. japonicus* frente a los que se han obtenido anticuerpos.

PEPTIDO	DOMINIO DE LA NR
44 SSSDDDDDEKDDASILKD 60 (S-17-Y)	Extensión N-terminal
298 TEEECDGHYHYKDNRVLPS 316 (T-19-S)	MoCo
626 ITTMSLPLPRRK 638 (I-14-Y)	Bisagra hemo/FAD

A partir de la secuencia del clon de la NR de *L. japonicus* se obtuvieron tres péptidos sintéticos para la obtención de anticuerpos. La tabla muestra la secuencia de los péptidos, y la localización de éstos en los distintos dominios de la NR de *L. japonicus*.

La reacción de los antisueros obtenidos con cada péptido se analizó mediante ELISA. La Fig. 30 muestra las curvas de calibrado de ELISA de los antisueros contra los distintos péptidos. Cuando los sueros fueron usados para analizar mediante ELISA la proteína NR en extractos crudos de raíces de *L. japonicus* en las condiciones óptimas, se obtuvieron diferencias de absorbancia a 405 nm de alrededor de 0,1 o menores entre las curvas con suero inmune y el control con suero preinmune (Tabla 8).

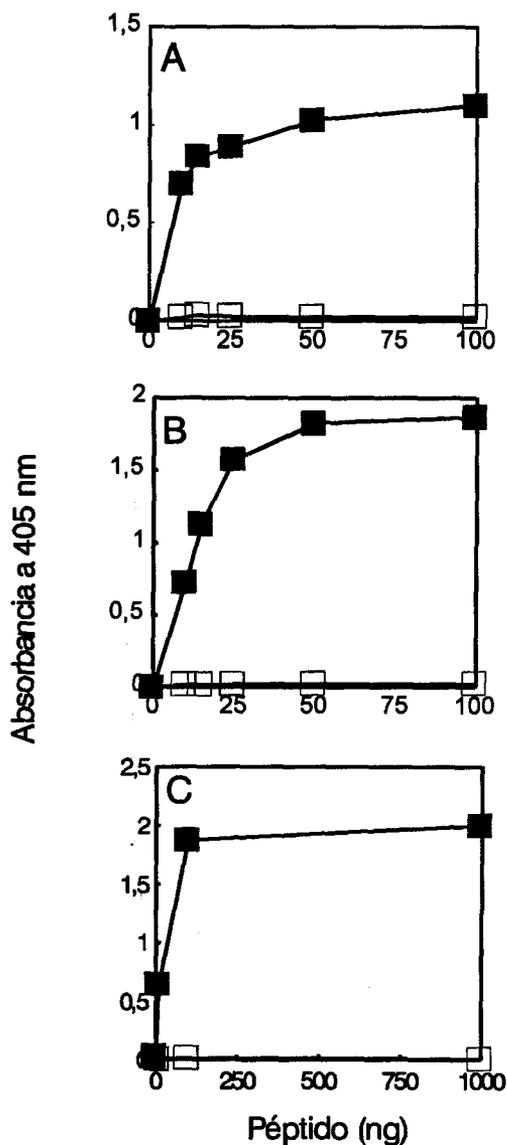


Fig. 30. Reacción por ELISA de los antiseros obtenidos frente a los respectivos péptidos sintéticos de la NR de *L. japonicus*. La figura muestra las curvas de calibrado de ELISA de los péptidos (A) T-19-S, (B) S-17-Y, (C) I-14-Y, en las reacciones con los antiseros correspondientes de los sangrados finales (544751, 544821, 893, respectivamente) (■-■). Los antiseros fueron usados a una dilución 1:1000. Se llevaron los controles paralelos de la reacción de los péptidos con los sueros preinmunes, a la misma dilución (□-□). La absorbancia a 405 nm fue determinada tras 2 horas (A), (B), y 30 minutos (C) de reacción de la peroxidasa con ABTS como sustrato. Más detalles en *Materiales y Métodos*.

Tabla 8. ELISA de extractos crudos de raíces de *L. japonicus* con los antiseros obtenidos frente a los péptidos sintéticos de la NR.

Suero (Péptido)	Dilución	Proteína (ng)	$\Delta A_{405 \text{ nm}}$
893 (I-14-Y)	1:1000	250	0,087
544751 (T-19-S)	1:1000	100	0,148
544806 (T-19-S)	1:1000	100	0,029
544821 (S-17-Y)	1:1000	100	0,023
544851 (S-17-Y)	1:1000	100	0,089

La reacción de la NR en extractos crudos con los antiseros obtenidos frente a los péptidos sintéticos fue analizada mediante ELISA. La tabla muestra las diferencias de absorbancia a 405 nm ( $\Delta A_{405 \text{ nm}}$ )

determinadas en las reacciones de los extractos crudos con los sueros inmunes y preinmunes tras 12 horas de reacción de la peroxidasa con ABTS como sustrato (más detalles en *Materiales y Métodos*).

A pesar de la débil reacción mediante ELISA, los antisueros frente a péptidos de la NR se usaron para analizar la reacción con la proteína mediante inmunodetección en filtro a partir de precipitados del 0-40% de sulfato amónico de los extractos crudos de raíces. Cuando se probó la mezcla a partes iguales de cada pareja de antisueros obtenidos contra cada péptido, sólo los sueros obtenidos frente al péptido T-19-S, localizado en el dominio del cofactor de molibdeno, dieron reacción específica con una cadena polipeptídica de masa molecular esperada para la NR (estimada en 100 kDa) (Fig. 31 A). Haciendo uso de este sistema más sensible de revelado de los westerns pudo visualizarse incluso una débil banda en la reacción con los anticuerpos anti-péptido de la NR de tabaco (péptido correspondiente a los residuos 309-327) (Fig. 31 B). Los estudios de regulación que se mostrarán a continuación indicaron que la banda en cuestión respondía a diferentes situaciones como se esperaba de la NR, de ahí que se hayan utilizado estos anticuerpos como sonda para analizar a nivel de proteína la regulación de la NR de *L. japonicus*.

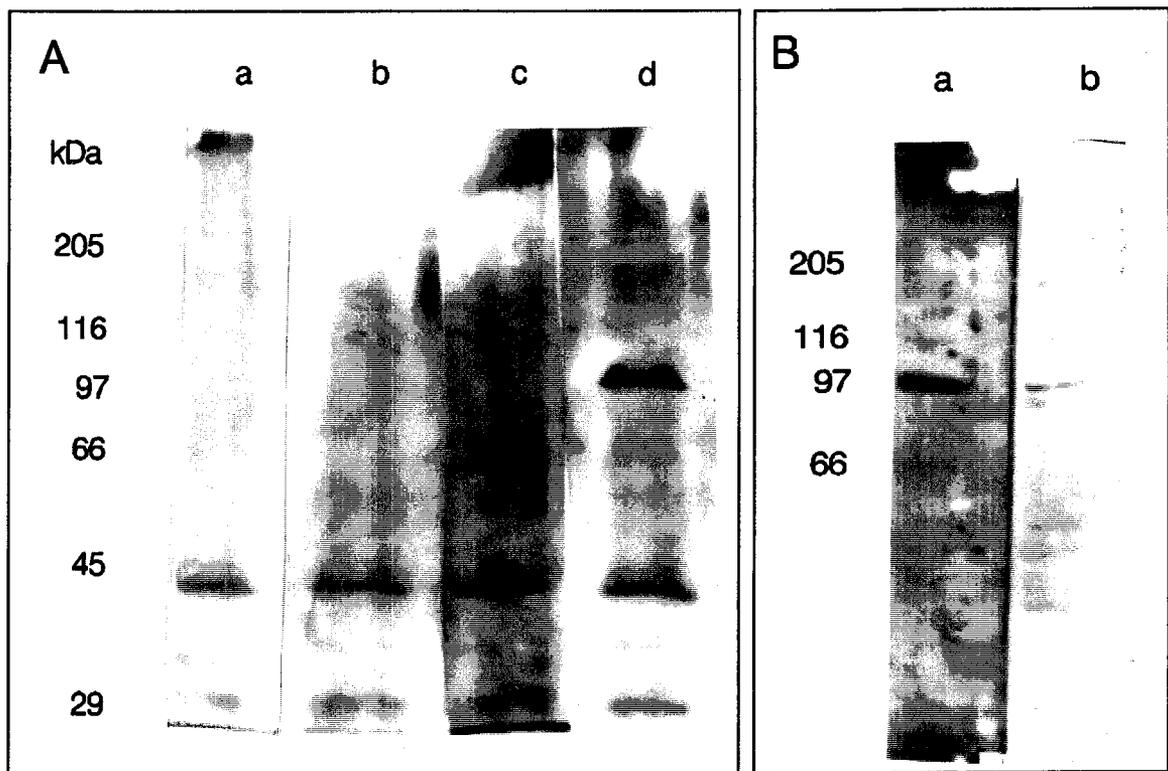


Fig. 31. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la NR de raíces de *L. japonicus* con los antisueros obtenidos frente a distintos péptidos sintéticos. (A) Se obtuvo un extracto crudo de raíces de plantas de 6 trifolios ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ). El extracto se precipitó entre el 0-40% de sulfato amónico, concentrándose respecto al extracto crudo de partida. La actividad específica NR en el precipitado fue de  $0,66 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . 500  $\mu\text{g}$  de proteína de la preparación anterior se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección en filtro con los antisueros: (a) sueros no inmunes, (b) sueros obtenidos frente al péptido S-17-Y, (c) sueros obtenidos frente al péptido I-14-Y, (d) sueros obtenidos frente al péptido T-19-S. En todos los casos los sueros se usaron a una dilución 1:250. Más detalles en *Materiales y Métodos*.

Es importante destacar, no obstante, que sólo uno de los tres tipos de anticuerpos anti-péptido dio los resultados que se esperaban y que estos resultados sólo se lograron recurriendo a la gran sensibilidad proporcionada por los nuevos sistemas de detección basados en la quimioluminiscencia. Nuestra experiencia es que los anticuerpos anti-péptido para la NR pueden proporcionar resultados pero con baja sensibilidad y posibilidades de éxito, si bien es una vía válida para evitar purificaciones masivas dado el bajo nivel presente de esta proteína. Esta situación pensamos que es extrapolable a otras especies ya que con frecuencia se presenta el problema de escasa reacción cruzada con otros anticuerpos.

## 2. EXPRESIÓN DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA EN RAICES DE *Lotus japonicus*.

### 2.1. Influencia de la edad y/o condiciones de cultivo de las plantas.

El nivel de actividad NR en extractos crudos de raíces de plantas de *L. japonicus* cultivadas en vermiculita en semilleros e irrigadas con la misma solución nutritiva resultó ser altamente variable, hasta el punto que las plantas presentaban muchas veces niveles de actividad NR prácticamente indetectables. La misma situación se dio en plantas cultivadas según un método de cultivo completamente distinto, como es el cultivo aeropónico (cedidas por el Dr. B. Hirel, INRA, Versailles, Francia). Por este motivo procedimos a hacer un análisis más detallado de la influencia de la edad y/o condiciones de cultivo sobre los niveles de actividad NR de raíces de esta planta, para saber si podía ser ésta una de las causas de la variabilidad observada. Como muestra la Fig. 32 la actividad NR fue mayor en extractos crudos de raíces de plantas jóvenes cultivadas en semilleros, alcanzando un nivel máximo en plantas de alrededor de 20 trifolios. En raíces de plantas de más edad, cultivadas en las mismas condiciones, se observó una caída progresiva en los niveles de actividad detectable en extractos crudos, llegando a hacerse prácticamente indetectable.



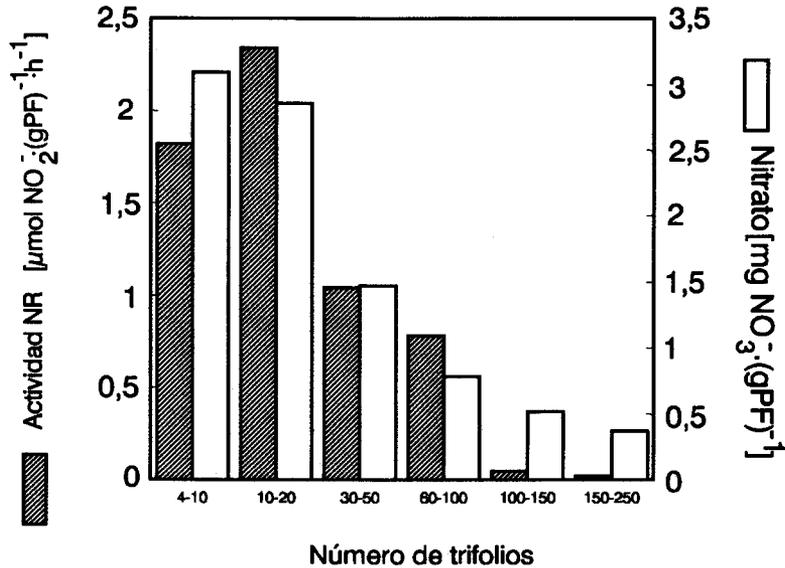


Fig. 32. Variación de los niveles de actividad NR y del contenido de nitrato en raíces de *L. japonicus* durante el crecimiento en semilleros. La actividad NR y el nitrato acumulado fueron determinados en extractos crudos ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces de plantas con distinto número de trifolios. Los resultados de las medidas fueron agrupados en intervalos correspondientes a distinto número de trifolios.

La disminución en la actividad de la NR en materiales más maduros se comprobó que iba acompañada de un cambio paralelo en los niveles de nitrato acumulado intracelularmente (Fig. 32), a pesar de que las plantas mostraban un aspecto normal y producían flores y semillas. Esta circunstancia nos hacía pensar que la disminución en actividad NR observada no era probable que estuviese provocada artefactualmente por las condiciones de extracción y medida, ya que se daba conjuntamente con la determinación analítica de nitrato, procesos ambos muy diferentes entre sí. Más bien pensamos que la disminución conjunta de la actividad NR y el nitrato acumulado podía obedecer a algún mecanismo regulatorio de las etapas iniciales de la asimilación de nitrato. Como se verá en la Fig. 41, la actividad NiR, sin embargo, no parecía disminuir de una manera tan acentuada como la NR y el nitrato acumulado.

Cuando las plantas se cultivan en condiciones similares pero en macetas, donde disponen de un mayor volumen para enraizar, pudo observarse también una disminución en la actividad NR y en el nitrato acumulado, si bien ésta ocurría en plantas con mayor número de trifolios que en las que crecieron en semilleros (Fig. 33). En estas condiciones, las plantas de alrededor de 200 trifolios mostraban niveles altos de actividad NR, mientras en semilleros era prácticamente indetectable (Fig. 32). Sin embargo, la actividad NR fue muy baja en los extractos crudos de plantas más maduras cultivadas en macetas en las mismas condiciones. Cuando las raíces se

cortaban, las raíces regeneradas mostraban nuevamente niveles altos de actividad y nitrato acumulado (A. Orea, comunicación personal). Estos resultados indican que los cambios observados en los niveles de actividad y en el nitrato acumulado parecen responder más bien a situaciones de estrés presentes en las distintas condiciones de cultivo de las plantas, posiblemente la limitación de espacio para el enraizamiento, que a la edad *per se*, pues los cambios observados no son fijos en un determinado estado de desarrollo.

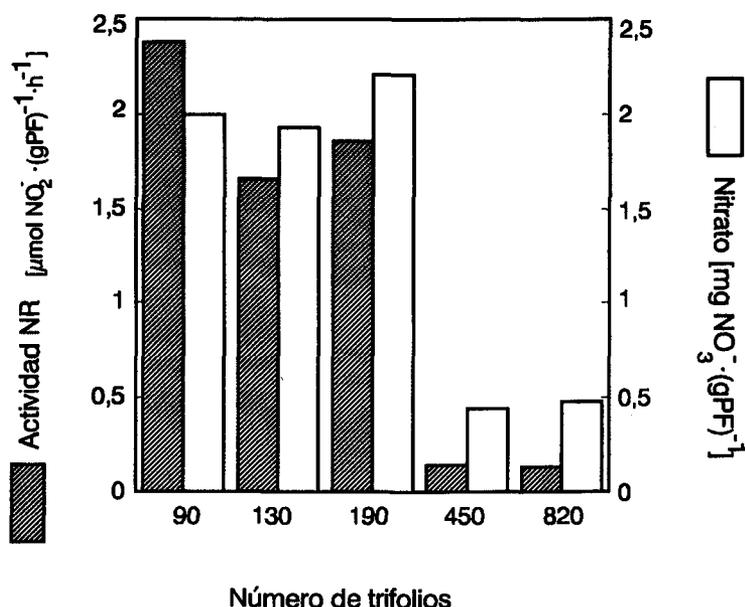


Fig. 33. Variación de la actividad NR y del nitrato acumulado en raíces de plantas de distinto número de trifolios cultivadas en macetas. La actividad NR y el contenido de nitrato fue determinado en extractos crudos de raíces (5 ml·gPF<sup>-1</sup>) de plantas cuyo número de trifolios se indica.

En plantas cultivadas en cajas Magenta (A. Orea, comunicación personal) y en plantas en cultivo aeropónico (Dr. Ian Prosser, IACR-Long Ashton, Bristol, U.K., comunicación personal) ha podido comprobarse también una disminución de los niveles de actividad NR en extractos crudos de raíces, incluso en plantas más tempranas. No sabemos si en estas condiciones puede producirse la misma situación de estrés que en nuestras condiciones ordinarias de cultivo u otro tipo de estrés distinto.

Los anticuerpos obtenidos frente a péptidos de la NR se usaron para analizar los niveles de proteína NR en raíces de plantas de distinta edad cultivadas en semilleros. Los extractos crudos de raíces se precipitaron con sulfato amónico entre el 0-40% con idea de concentrar la proteína en dichas preparaciones. Como muestra la Fig. 34, la abundancia relativa de la proteína NR en raíces de plantas maduras fue inferior a la detectada en raíces jóvenes. Sin embargo, los cambios observados en los niveles de actividad enzimática

en los extractos crudos de raíces durante el crecimiento de las plantas en semilleros fueron más marcados que los observados a nivel de proteína.

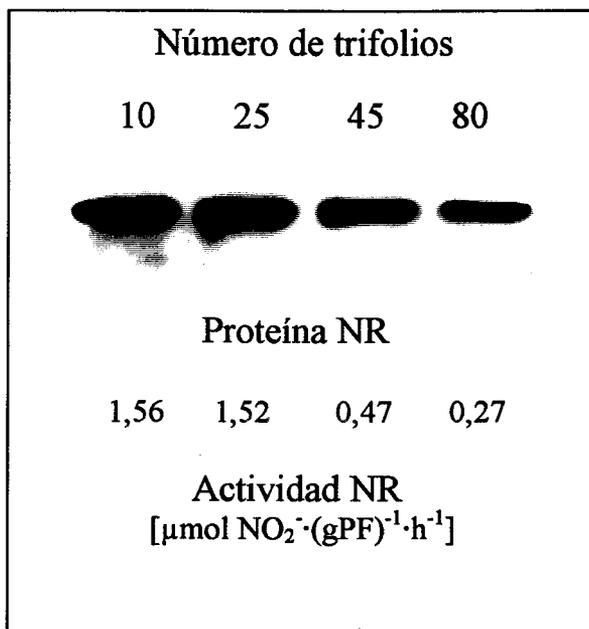


Fig. 34. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la NR de raíces de plantas cultivadas en semilleros. Se obtuvieron extractos crudos ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces de plantas de distinto número de trifolios. La actividad NR fue determinada en los extractos. 5 ml de cada extracto se precipitaron entre el 0-40% de sulfato amónico y el precipitado se redisolvió en 0,3 ml. La proporción de proteína precipitada respecto a la proteína total de los extractos fue del 47, 53, 50 y 41%. 300  $\mu\text{g}$  de proteína de los precipitados se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección en filtro con los antisueros frente al péptido T-19-S. Más detalles en *Materiales y Métodos*.

Los resultados anteriores podrían indicar la presencia de proteína NR parcialmente inactiva en los extractos crudos de raíces de las plantas maduras y podrían sugerir la presencia de factor(es) inactivante(s) en los extractos de raíces de *L. japonicus*.

La modulación post-traducciona parece jugar un papel importante en la regulación de la NR y ha constituido un área de extensos estudios en los últimos años. Diferentes tipos de factores que pueden afectar los niveles de actividad NR han sido descritos. Algunos de estos factores parecen ser endopeptidasas más o menos específicas (Wallace y Oaks, 1986; Batt y Wallace, 1989), que se relacionan con niveles reducidos de actividad NR, y han sido identificados y purificados en raíces de maíz (Wallace, 1974; Yamaya et al., 1980a y b) y en hojas de cebada (Hamano et al., 1983). Por otro lado, también se han referido proteínas inactivadoras que parecen no actuar mediante proteólisis limitada, sino más bien por unión a la NR. Tal tipo de proteínas inactivantes pueden llevar a la pérdida reversible de actividad NR (Yamaya et al., 1980 b; Solomonson et al., 1984) o bien irreversible

(Sherrard et al., 1979; Yamagishi et al., 1988). Recientemente los estudios sobre la regulación post-traducciona l de la NR se han centrado fundamentalmente en el mecanismo de inactivación rápido y reversible que implica la fosforilación de la proteína, llevando a una forma activa de la enzima, pero que es susceptible de ser inactivada por la unión de la proteína NIP (Nitrate reductase Inhibitor Protein) en presencia de cationes  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  (MacKintosh et al., 1995; MacKintosh, 1997). En hojas de espinaca, los cambios rápidos observados en los niveles de actividad enzimática en las transiciones de luz a oscuridad y en respuesta a los niveles de  $CO_2$  se han relacionado con un distinto estado de activación de la enzima en el que parece estar implicado este mecanismo de fosforilación reversible (Huber et al., 1994b; Glaab y Kaiser, 1995; MacKintosh et al., 1995). La regulación descrita de la NR de espinaca ha sido también observada en otras especies (de Cires et al., 1993a y b; Lillo, 1993; Huber et al., 1994a; Kojima et al., 1994; Bergareche et al., 1994; LaBrie y Crawford, 1994; Merlo et al., 1995; Nussaume et al., 1995). De hecho, se ha demostrado que la enzima de maíz y *Arabidopsis*, al igual que la de espinaca, es fosforilada en un residuo de serina (Huber et al., 1994b; LaBrie y Crawford, 1994; Douglas et al., 1995). En raíces de guisante y cebada se ha referido un mecanismo de fosforilación similar al descrito para la enzima de hojas de espinaca, que podría controlar los cambios en los niveles de actividad NR en respuesta a la concentración externa de oxígeno (Glaab y Kaiser, 1993; Botrel et al., 1996).

Ya que este mecanismo de control post-traducciona l no parece ser exclusivo de la enzima de espinaca, hemos analizado si podría operar sobre la NR en raíces de *L. japonicus*. Aunque está establecido que dicho mecanismo actúa para modular rápidamente la actividad de la NR en respuesta a señales que pueden cambiar rápidamente, como la luz o los niveles de  $CO_2$ , la operatividad de tal mecanismo en la regulación de la actividad NR en relación con las situaciones de estrés en el cultivo durante el crecimiento de las plantas sería de gran interés y una situación no explorada por el momento.

## **2.2. Estudio de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa en presencia de cationes $Mg^{2+}$ (sistema reversible de fosforilación).**

Se determinaron los niveles de actividad NR en extractos crudos de raíces obtenidos y ensayados en presencia de EDTA o  $MgCl_2$ . En presencia de cationes  $Mg^{2+}$ , los niveles de actividad NR fueron del orden del 30 al 40% de los obtenidos en presencia de EDTA. La enzima inactivada en presencia de cationes  $Mg^{2+}$  pudo ser ligeramente reactivada *in vitro* por la incubación

durante 20 minutos a 20°C en presencia de EDTA en exceso. En presencia de AMP se observó un mayor grado de reactivación de la enzima. La reactivación de la NR en los extractos de raíces de *L. japonicus* fue completa con la acción conjunta de estos compuestos. La simple incubación a 20°C durante 20 minutos y a 0°C durante una hora llevó sólo a una ligera reactivación de manera espontánea de la enzima previamente inactivada por  $Mg^{2+}$ . Todos estos resultados se resumen en la Tabla 9 y sugieren la presencia de un mecanismo de inactivación reversible similar al que se ha descrito en espinaca en raíces de *L. japonicus* (Kaiser et al., 1992; Kaiser y Huber, 1994; Huber y Huber, 1995).

Tabla. 9. Inactivación por cationes  $Mg^{2+}$  y reactivación *in vitro* de la NR de raíces de *L. japonicus*.

Condiciones de extracción y de ensayo	Condiciones de reactivación	Actividad NR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Inhibición por $Mg^{2+}$ (%)
EDTA	-	0,157	59
$MgCl_2$	-	0,064	
EDTA	20 min. a 20 °C	0,134	46
$MgCl_2$	20 min. a 20 °C	0,072	
"	20 mM EDTA (20 min. a 20°C)	0,086	36
"	5 mM AMP (20 min. a 20 °C)	0,116	13
"	20 mM EDTA + 5 mM AMP (20 min. a 20°C)	0,138	0
EDTA	1 h. a 0°C	0,146	45
$MgCl_2$	1 h. a 0°C	0,080	

Se obtuvieron extractos crudos ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) a partir de raíces de plantas de 20 trifolios, extraídas en tampón 100 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10  $\mu\text{M}$  FAD, 3% (p/v) BSA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, suplementado con 10 mM EDTA ó 10 mM  $MgCl_2$ . Los extractos fueron dializados en Sefadex G-25 equilibrada en los mismos tampones. 250  $\mu\text{l}$  de los extractos dializados se incubaron con 250  $\mu\text{l}$  de los tampones de ensayo de actividad NR que se describen en *Materiales y Métodos*. Partes alícuotas del extracto obtenido en 10 mM  $MgCl_2$  se incubaron durante 20 minutos a 20°C en presencia de 5 mM AMP, 20 mM EDTA, o de ambos. Como control se incubaron a la misma temperatura partes alícuotas de los extractos sin adición alguna. La actividad NR se determinó en cada incubación según el tipo de ensayo que se indica. La reactivación se probó también incubando partes alícuotas de los extractos durante 1 hora a 0°C. El porcentaje de inhibición por  $Mg^{2+}$  se calculó a partir de las actividades determinadas en los ensayos con EDTA o  $MgCl_2$ , de acuerdo con MacKintosh et al. (1995).

No obstante, el nivel de actividad NR en las raíces de *L. japonicus* se mantuvo prácticamente estable en las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo, así como el nivel de inhibición de la enzima por cationes  $Mg^{2+}$  (Fig. 35), a diferencia de lo que ocurre en hojas de espinaca, donde la inactivación se detecta en mayor grado en oscuridad, si bien se alcanza un nivel de inactivación similar al que nosotros detectamos en raíces de *L. japonicus*. En raíces de guisante y cebada, se han descrito cambios en el estado de activación de la NR, si bien éstos no se producen en respuesta a las transiciones de luz/oscuridad, sino en respuesta a las transiciones desde condiciones de anaerobiosis, donde la enzima es activa, a hiperaerobiosis, en que se detecta una mayor sensibilidad de la enzima al  $Mg^{2+}$  (Glaab y Kaiser, 1993; Botrel et al., 1996).

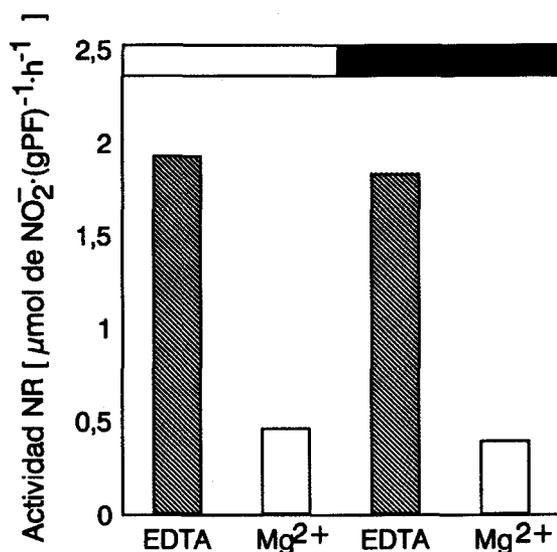


Fig. 35. Niveles de actividad NR en raíces de *L. japonicus* durante las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo. Las plantas se cultivaron en macetas bajo un régimen de 16 h. luz/ 8 h. oscuridad. Las raíces de las plantas se recogieron en la primera hora del periodo de luz y la penúltima hora del periodo de oscuridad. Cada material fue extraído en relación  $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$  en el mismo tampón con 10 mM de EDTA ó 10 mM de  $MgCl_2$ , y ensayado según se indica en *Materiales y Métodos*.

Hemos examinado si la inactivación por  $Mg^{2+}$  podría estar implicada en la disminución de actividad NR que hemos observado durante el crecimiento de las plantas en semilleros. La Fig. 36 muestra que la actividad NR disminuyó de manera similar en los extractos crudos de raíces de distinta edad tanto en presencia como en ausencia de cationes  $Mg^{2+}$ . El nivel de inhibición por  $Mg^{2+}$ , tal como ha sido definido por MacKintosh et al. (1995), no varió sustancialmente en las raíces de distinta edad. Estos resultados sugieren que el

mecanismo de fosforilación reversible no tiene gran significación en la regulación de la NR de las raíces de plantas de *L. japonicus* con la edad y/o condiciones de cultivo.

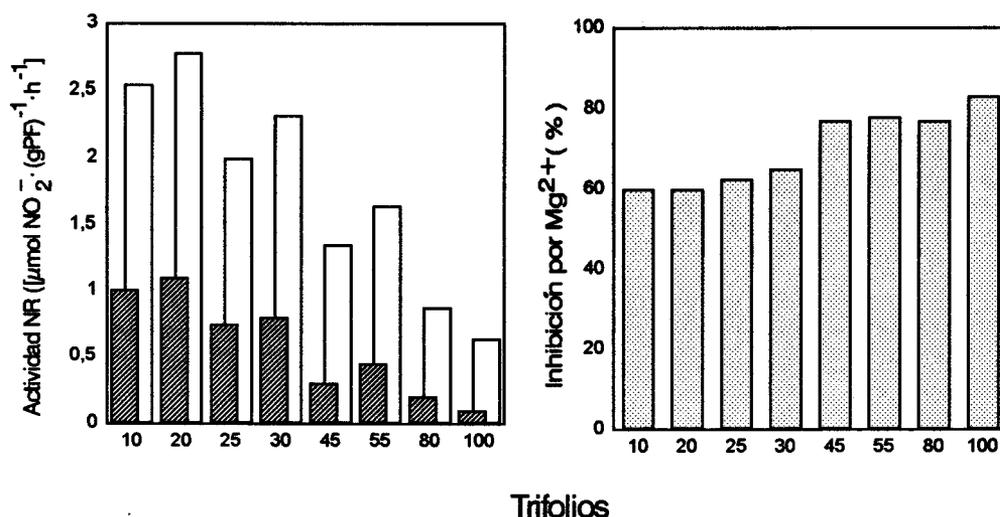


Fig. 36. Actividad NR e inhibición por Mg<sup>2+</sup> en extractos de raíces de plantas de distinta edad cultivadas en semilleros. Se obtuvieron extractos crudos (5 ml·gPF<sup>-1</sup>) de raíces de plantas de distinto número de trifolios en el mismo tampón descrito en la Tabla 9, suplementado con 10 mM de EDTA ó 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. La actividad NR fue determinada en los extractos en ensayos con EDTA (□) o MgCl<sub>2</sub> (▨), que se muestran en el gráfico A. El gráfico B recoge el porcentaje de inhibición por Mg<sup>2+</sup>.

### 2.3. Análisis de la presencia de factores inactivantes de la NADH-nitrato reductasa en extractos crudos de raíces aparentemente no relacionados con el mecanismo de fosforilación reversible.

Ya que el mecanismo de fosforilación reversible no parecía ser muy significativo en la modulación de los niveles de actividad NR en las raíces de las plantas cultivadas en semilleros, se analizó la posible presencia de otros factores inactivantes no relacionados con este mecanismo. Para ello, los ensayos de actividad se efectuaban en presencia de 10 mM de EDTA y ausencia de cationes Mg<sup>2+</sup> añadidos, con lo que según lo propuesto en espinaca, el mecanismo de inactivación por fosforilación reversible está enmascarado, alcanzándose niveles máximos de actividad. Con estas condiciones de ensayo el diseño experimental escogido consistió en preparar una fuente de actividad NR (un precipitado 0-40% de sulfato amónico de extractos crudos de raíces jóvenes) a la que se añadían extractos o fracciones de los mismos procedentes de plantas con bajos o nulos niveles de actividad.

Normalmente se probó la presencia de factores inactivantes de NR en distintas fracciones obtenidas mediante filtración a través de una membrana de AMICON a partir de los extractos crudos de raíces con bajos niveles de actividad NR. Así se separaban los componentes de alto (HMW) y bajo peso molecular (LMW), tal como se indica en *Materiales y Métodos*. Como muestra la Tabla 10 la actividad NR presente en la preparaciones NR resultó inhibida por la adición de la fracción 40-70% HMW, y se observó un mayor nivel de inactivación al aumentar la concentración de dicha fracción en las incubaciones. El máximo nivel de inactivación se consiguió al incubar el precipitado 0-40% NR simultáneamente con las fracciones 40-70% HMW y LMW. Sin embargo, la fracción LMW por sí sola no inactivó la NR, a pesar de que se probaron distintas concentraciones de esta fracción en las incubaciones. La adición de cantidades crecientes de la fracción LMW, manteniendo constante la cantidad de la fracción 40-70% HMW, supuso un creciente nivel de inactivación de la NR. Estos resultados indican que la inactivación detectada está mediada por componentes de alto y bajo peso molecular.

Tabla. 10. Inactivación de la NR usando fracciones de los extractos crudos.

Fuente de NR	Incubación		Actividad NR final (%)
	40-70%HMW ( $\mu$ l)	LMW ( $\mu$ l)	
Extracto crudo	-	-	100
“	10	-	99
“	50	-	56
Precipitado 0-40 % de sulfato amónico	-	-	100
“	10	-	96
“	50	-	78
“	-	100	100
“	-	175	100
“	50	50	67
“	50	100	59
“	50	175	42
“	10	175	98

Un extracto crudo ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces de plantas de *L. japonicus* de 100 trifolios fue fraccionado en una unidad de filtración AMICON, a través de una membrana de tamaño de exclusión Mr 10.000, durante dos horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fracción de componentes de alto peso molecular (HMW) se precipitó entre el 40-70% de sulfato amónico y se dializó, concentrándose aproximadamente 25 veces respecto al extracto crudo inicial. Las cantidades que se indican de las fracciones 40-70% HMW y LMW fueron incubadas con una cantidad constante ( $75 \mu\text{l}$ ) de un extracto crudo ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces de plantas con buena actividad NR (15 trifolios), o bien con el mismo volumen de su precipitado 0-40% de sulfato amónico. Ambas preparaciones de NR eran dializadas, y mostraban actividades de  $0,234$  y  $0,560 \mu\text{mol NO}_2^{-} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. Los volúmenes de incubación fueron completados hasta  $300 \mu\text{l}$  con el tampón de extracción. A estas incubaciones se le añadieron los reactivos para el ensayo de actividad NR. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad en las preparaciones de NR sin adición.

La inactivación de la NR por estos componentes resultó ser muy rápida, ya que se detectaba sin necesidad de incubación previa al ensayo de actividad, e incluso durante el tiempo del propio ensayo de actividad (Fig. 37).

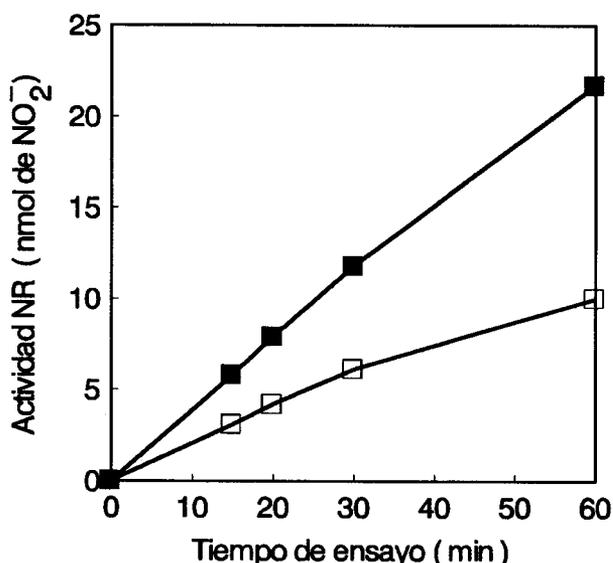
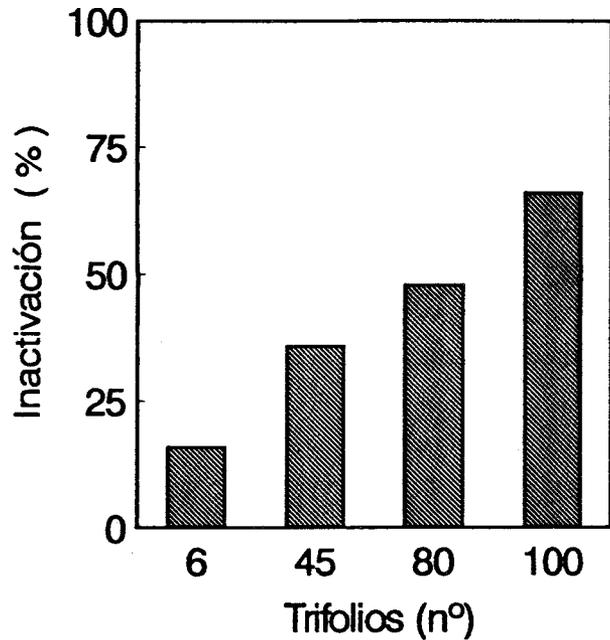


Fig. 37. Inactivación de la NR durante el ensayo de actividad en presencia de las fracciones HMW y LMW de un extracto crudo. 75 µl de un precipitado 0-40% de sulfato amónico, de un extracto crudo con buena actividad (0-40% NR) se incubaron con 32 µl de la fracción 40-70% HMW y 175 µl de la fracción LMW, obtenidas de un extracto crudo de raíces de plantas de 80 trifolios. La actividad NR fue determinada en las incubaciones a distintos tiempos de ensayo (□-□), así como en el precipitado 0-40% NR sin adición (■-■).

Para examinar si la disminución de la actividad NR durante el crecimiento de las plantas en semilleros estaba relacionada con la acumulación de estos factores, se obtuvieron las fracciones 40-70% HMW y LMW de raíces de plantas de creciente edad, y se determinó el nivel de inactivación de la NR. La Fig. 38 muestra que había una mayor capacidad de inactivación por las fracciones de los materiales de más edad, indicando posiblemente una mayor acumulación de estos factores con la edad y/o con situaciones de estrés ligadas al sistema de cultivo.

En base a estos resultados se procedió a una serie de experimentos encaminados a identificar, aunque fuera de una forma preliminar, la posible naturaleza de esta clase de elementos inactivantes observada.

Fig. 38. Grado de inactivación de la NR producido por las fracciones HMW y LMW de extractos crudos de raíces de distinta edad. 6,51 pkat de actividad NR (75  $\mu$ l de un precipitado 0-40% NR) se mezclaron con un mismo volumen de las fracciones 40-70% HMW (50  $\mu$ l) y LMW (175  $\mu$ l), obtenidas a partir de extractos crudos de raíces de plantas de distinta edad cultivadas en semilleros. Tras la adición de los reactivos para el ensayo, se determinó la actividad NR en las incubaciones. La figura muestra el porcentaje de inactivación en las diferentes incubaciones calculado respecto a la actividad del control sin adición de las fracciones HMW y LMW ( $0,293 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )



En primer lugar, ya que las fracciones 40-70% HMW estaban concentradas respecto al extracto crudo de partida, y en las incubaciones se añadía de esta fracción una considerable concentración de proteína ( $0,5-1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el ensayo), se analizó la posibilidad de que la inactivación se debiera a un efecto oncótico. Cuando un precipitado 0-40% NR se incubaba con BSA a la misma concentración de proteína que la fracción 40-70% HMW, y en presencia de la fracción LMW, no se observó la inactivación de la NR anteriormente descrita, indicando que la inactivación de la NR no se debía a un efecto de la concentración de la proteína en la fracción 40-70% HMW (Fig. 39), sino a algún componente de la misma.

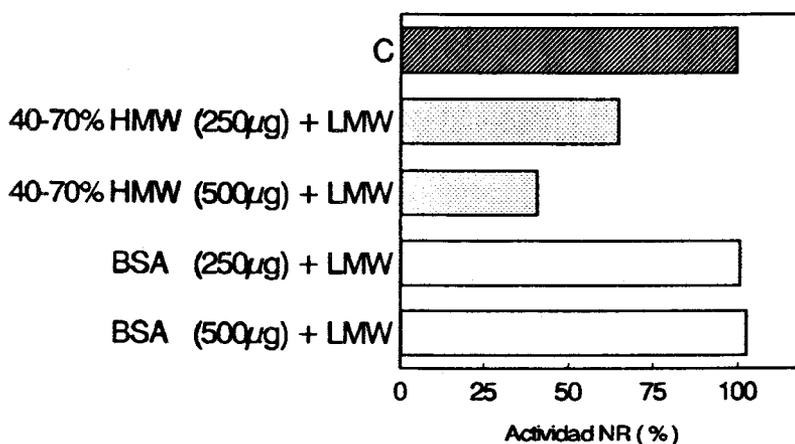


Fig. 39. Comparación del efecto oncótico de la concentración de proteína HMW en la inactivación de la NR de raíces de *L. japonicus* con una cantidad equivalente de BSA. A 5,7 pkat de actividad NR (75  $\mu$ l de un precipitado 0-40% obtenido a partir de un extracto crudo de raíces de 15 trifolios) se añadieron 25 ó 50  $\mu$ l de la fracción 40-70% HMW ( $10 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) o cantidades equivalentes de BSA junto con 175  $\mu$ l de la fracción LMW en todos los casos. Las fracciones 40-70% HMW y LMW fueron obtenidas a partir de un extracto crudo de raíces de 100 trifolios. El volumen de las incubaciones se completó

hasta 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción. Tras la adición de los reactivos para la reacción de la NR, se determinó la actividad en las incubaciones, que se expresa como porcentaje de la actividad en el control sin adición (C) ( $0,274 \mu\text{mol NO}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Teniendo en cuenta que los componentes de alto peso molecular requeridos en la inactivación de la NR pudieron ser fraccionados mediante sulfato amónico, se examinó la posible naturaleza proteica de estos componentes. En primer lugar se analizó si el componente inactivador era sensible a proteasas. Para ello, se examinó el efecto inactivador de la fracción 40-70% HMW después de un tratamiento con tripsina, determinándose la actividad NR en esta incubación. Obviamente era preciso inactivar la tripsina (con inhibidor de tripsina) después de su acción sobre la fracción 40-70% HMW, y antes de la incubación con la NR, por ser ésta una enzima especialmente sensible a tripsina. Como muestra la Tabla 11, el pretratamiento de la fracción 40-70% HMW con tripsina no tuvo efecto en aliviar la inactivación que dicha fracción producía sobre la actividad NR.

Tabla. 11. Efecto del tratamiento con tripsina de la fracción 40-70% HMW en la inactivación de la NR de raíces de *L. japonicus*.

Sistema de incubación	Actividad NR (%)
(A) NR + tripsina + inhibidor de tripsina	100
(B) NR + 40-70% HMW + tripsina + inhibidor de tripsina + LMW	45
(C) NR + 40-70% HMW + LMW	48

50  $\mu\text{l}$  de la fracción 40-70% HMW obtenida a partir de un extracto crudo de raíces de 100 trifolios fue preincubada en presencia de tripsina ( $0,166 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) durante 20 minutos a  $25^\circ\text{C}$  y posteriormente bloqueada con inhibidor de tripsina ( $0,28 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (B). Como control se incubó la misma fracción sin adición alguna (C), o bien con tripsina bloqueada desde el comienzo de la incubación con inhibidor de tripsina (A). Las incubaciones se ajustaron a un mismo volumen final con tampón estándar (sin leupeptina). Tras la incubación de 20 minutos a  $25^\circ\text{C}$ , se añadió a las incubaciones 175  $\mu\text{l}$  de la fracción LMW obtenida a partir del mismo extracto crudo, y 10,29  $\mu\text{kat}$  de actividad NR (75  $\mu\text{l}$  de un precipitado 0-40% NR, obtenida a partir de un extracto crudo de raíces de 15 trifolios). En ese momento se iniciaba la reacción de la NR mediante la adición de los reactivos del ensayo a las diferentes incubaciones. La actividad final alcanzada se expresa como porcentaje de la actividad en (A) ( $0,494 \mu\text{mol NO}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Las preparaciones de fracciones inactivantes y el precipitado 0-40% NR fueron obtenidos en tampón estándar sin leupeptina.

Cuando la fracción 40-70% HMW se precipitaba con TCA (precipitación característica de componentes proteicos), la fracción soluble resultante de la precipitación, una vez neutralizada, retenía la capacidad de inactivar a la NR (Tabla 12). Estos resultados sugerían que los componentes de alto peso molecular requeridos para la inactivación de la NR no eran de naturaleza proteica, pues no precipitaban con TCA ni eran susceptibles de degradación por tripsina.

Tabla 12. Efecto de la precipitación con TCA de la fracción 40-70% HMW en la inactivación de la NR de raíces de *L. japonicus*.

Sistema de incubación	Actividad NR (%)
NR	100
NR + fracción soluble TCA + LMW	55

La fracción 40-70% HMW obtenida a partir de un extracto crudo de raíces de plantas de 100 trifolios fue precipitada con TCA a una concentración final del 10%. El sobrenadante de la precipitación se neutralizó con NaOH 2N. 40  $\mu\text{l}$  del mismo se añadieron a 7,3 pkat de actividad NR (90  $\mu\text{l}$  de un precipitado 0-40% NR) en presencia de 150  $\mu\text{l}$  de la fracción LMW, obtenida también a partir del extracto crudo de raíces de 100 trifolios. Las incubaciones se llevaron hasta un volumen de 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción, añadiéndose después los reactivos del ensayo de actividad NR a las incubaciones. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad NR en el control sin adición ( $0,293 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Otro aspecto que nos interesaba analizar era si la inactivación podía ser revertida de alguna manera. Teniendo en cuenta que para que ésta ocurriese se requerían componentes de bajo peso molecular, se examinó si tras la diálisis de las incubaciones en que la NR había sido inactivada se podía recuperar la actividad. La Tabla 13 muestra que la diálisis no tenía ningún efecto en revertir la inactivación de la NR, lo cual sugería un efecto estable sobre la NR de los componentes que median en la inactivación.

Tabla 13. Efecto de la diálisis sobre la inactivación de la NR.

Sistema de incubación	Actividad NR (%)
NR	100
NR + HLMW	4,2
NR + HLMW (incubación dializada)	9,1

La fracción HLMW fue obtenida a partir de un extracto crudo de raíces de plantas de 100 trifolios, concentrándose 10 veces respecto a éste. 100  $\mu\text{l}$  de la fracción anterior sin dializar se añadieron a 9,16 pkat de actividad NR (100  $\mu\text{l}$  de un precipitado 0-40% NR obtenido a partir de un extracto crudo de raíces de 15 trifolios) para examinar el nivel de actividad remanente antes y después de una diálisis durante 1 hora en un sistema de microdiálisis a 4°C. El 100% de actividad NR corresponde a  $0,33 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Stulen et al. (1971) describieron un inhibidor de la NR en cotiledones de rábano que podía ser excluido en extracciones con PVP. Esta posibilidad fue examinada en los extractos de raíces de *L. japonicus*, ya que los componentes que median la inactivación de la NR no parecían ser de naturaleza proteica. Cuando las fracciones 40-70% HMW y LMW se obtenían a partir de un extracto crudo preparado en presencia de PVPP, la inactivación de la NR que producían estas fracciones se prevenía casi totalmente (Tabla 14). Estos datos indican que los componentes que median la inactivación podían ser adsorbidos por la PVPP cuando ésta estaba presente en la extracción. La PVPP es un componente comúnmente añadido a las preparaciones de extractos para eliminar los compuestos fenólicos (Gegenheimer, 1990). Pensamos que la inactivación de la NR detectada en raíces de *L. japonicus* durante el crecimiento de las plantas en las condiciones de cultivo descritas puede estar provocada por compuestos fenólicos. No obstante, hay que señalar que tal tipo de compuestos son más bien característicos de otros tejidos (hojas, frutos, tubérculos) y plantas (Ozawa et al., 1987; Sánchez y Harwood, 1992; Friedman, 1997; Dirr et al., 1973).

Tabla. 14. Eliminación de la capacidad inactivante de las fracciones HMW y LMW sobre la NR, cuando se preparan en presencia de PVPP.

Extracción	Sistema de incubación	Actividad NR (%)
	NR	100
- PVPP	NR + 40-70% HMW +LMW	51
	NR	100
+ PVPP	NR + 40-70% HMW +LMW	107

Las fracciones 40-70% HMW y LMW fueron obtenidas a partir de extractos crudos de raíces de plantas de 80 trifolios en el tampón estándar (-PVPP), o en el mismo tampón suplementado con PVPP al 3% (p/v). 50 µl de las fracciones 40-70% HMW y 175 µl de las fracciones LMW se añadieron a 6,02 pkat de actividad NR (75 µl de un precipitado 0-40% NR de raíces de plantas de 25 trifolios en tampón estándar). Tras la adición de los reactivos del ensayo se determinó la actividad NR en las distintas incubaciones. Como controles se llevaron a cabo incubaciones similares en ausencia de HMW y LMW, que se indican como NR, y reflejan el 100% de actividad ( $0,289 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Con idea de comprobar si efectivamente los niveles de actividad NR extraíbles podían mejorarse con la presencia de PVPP en las extracciones, éstos se determinaron en extractos de raíces de plantas de creciente edad preparados en presencia o ausencia de PVPP en la extracción (Fig. 40). En los materiales más maduros, la actividad NR en las extracciones en ausencia de PVPP osciló entre un 33 y un 53% de la actividad determinada en los

extractos de los mismos materiales preparados en presencia de PVPP. Esta relación fue del 85-107% en los extractos de raíces de plantas más jóvenes.

Los resultados anteriores indican un efecto positivo de la PVPP en los niveles de actividad NR medibles en los extractos crudos, sobre todo en los materiales más maduros, posiblemente debido a una mayor acumulación de los compuestos fenólicos en estos materiales.

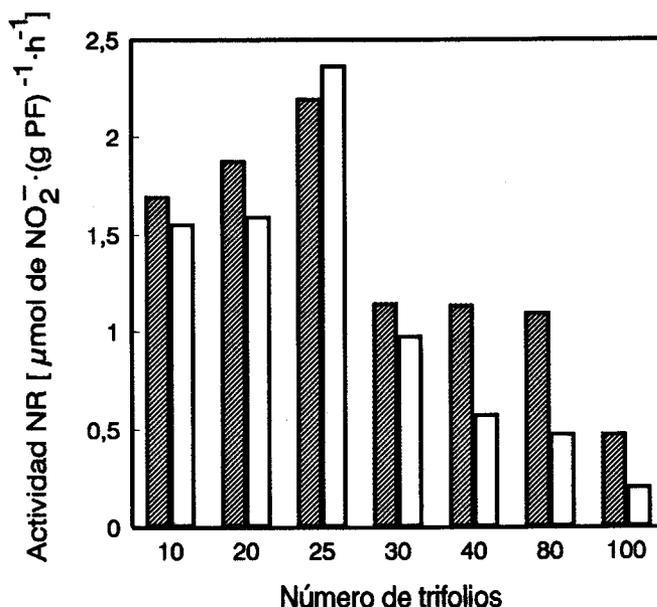


Fig. 40. Efecto de la PVPP sobre los niveles de actividad NR extraíble en extractos crudos de raíces de plantas de distinta edad. Los extractos crudos de raíces de plantas de distinto número de trifolios fueron obtenidos en relación 5 ml·gPF<sup>-1</sup>, en el tampón estándar (□) o en el mismo tampón suplementado con PVPP al 3% (p/v) (▨). La actividad NR fue determinada en los extractos crudos.

Hemos examinado también el grado de especificidad que podrían tener los componentes inactivantes examinados sobre la NR. Para ello se determinaron los niveles de actividad NiR en los extractos de raíces de plantas de creciente edad en presencia o ausencia de PVPP en la extracción (Fig. 41). Contrariamente a lo observado para la NR (Fig. 40), los niveles de NiR no parecían afectarse por la presencia de PVPP en la extracción sugiriendo una mayor sensibilidad de la NR a estos compuestos.

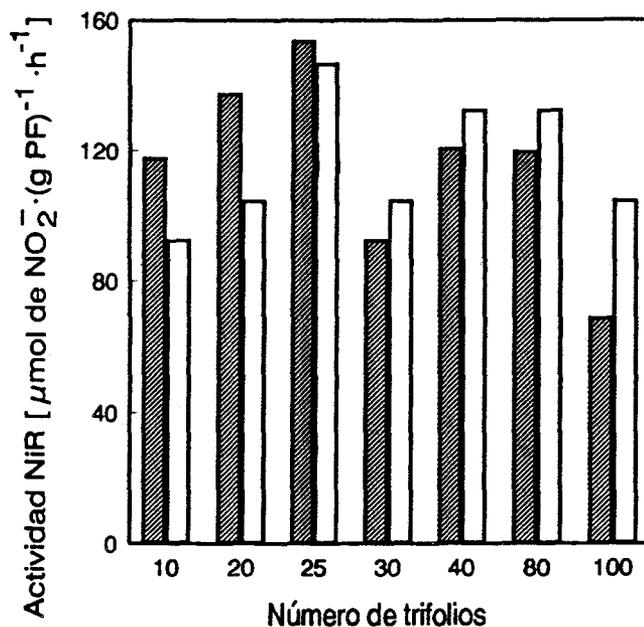


Fig. 41. Efecto de la PVPP sobre los niveles de actividad NiR extraíbles de extractos crudos de raíces de plantas de distinta edad. La actividad NiR fue determinada en los extractos crudos referidos en la Fig. 40.

En resumen, los resultados anteriores indican la presencia de factores de tipo no quinasa capaces de inactivar la NR en extractos crudos de raíces de *L. japonicus*. Estos factores están presentes como componentes de alto y bajo peso molecular, y parecen ser de tipo fenólico. Estos compuestos se acumulan en las raíces de plantas maduras cultivadas en semilleros, afectando los niveles de actividad NR detectables en los extractos crudos de estos materiales. Es interesante señalar que ya se ha referido con anterioridad el efecto inhibitorio de compuestos fenólicos sobre la NR en extractos crudos (Stulen et al., 1971; Dirr et al., 1973). Por otra parte, se sabe que la presencia de estos compuestos en plantas y su oxidación se producen en respuesta a daños mecánicos o a infecciones (Mayer y Harel, 1979; Friedman, 1997). Pensamos que la mayor acumulación de estos compuestos en las raíces de plantas más maduras de *L. japonicus* podría responder a situaciones de estrés relacionadas con la limitación de espacio para el crecimiento de las raíces en los semilleros.

#### 2.4. Expresión de la NADH-nitrato reductasa en raíces de plantas cultivadas en amonio.

Otra situación en la que pudo detectarse proteína NR sin actividad fue en las raíces de plantas cultivadas en amonio como única fuente de nitrógeno. La Fig. 42 muestra los resultados de inmunodetección en filtro de extractos crudos de raíces de plantas de *L. japonicus* cultivadas en cloruro amónico o nitrato amónico como fuentes de nitrógeno, en los que podía detectarse la proteína de 100 kDa correspondiente a la NR, aunque su abundancia fuese inferior en amonio que el nivel detectado en los materiales de raíces cultivadas en presencia de nitrato.

La presencia de NR en amonio y ausencia de nitrato es un resultado un tanto sorprendente, ya que el nitrato es una señal clave para inducir a la NR, haciendo esta proteína altamente original al ser una de las pocas enzimas inducibles por su sustrato que se conocen en plantas (Crawford y Arst, 1993). Sin embargo, en algunos casos se ha descrito la presencia de una forma de NR constitutiva como forma mayoritaria de esta enzima. Tal es el caso de la especie diploide del género *Aegilops* ancestro de las especies de trigo tetraploides y hexaploides usadas en agricultura (Ouhmidou et al., 1990). En soja, leguminosa donde no ha habido presión de selección para la utilización de nitrato, se ha descrito la presencia de formas constitutivas de NR (Nelson et al., 1983). Se ha descrito que la NR puede ser inducida incluso por concentraciones muy bajas de nitrato (del orden de 10  $\mu\text{M}$ ) (Daniel-Vedele y Caboche, 1996). En nuestras condiciones, los medios de cultivo de amonio fueron suplementados con inhibidores de la nitrificación (diciandiamida) y las raíces de las plantas cultivadas en amonio mostraron niveles de nitrato acumulado indetectables por métodos colorimétricos y HPLC ( $< 2 \mu\text{M}$ ) (A. Orea, comunicación personal). Sin embargo no podemos descartar la presencia de esta mínima concentración de nitrato suficiente para inducir a la NR a nivel de proteína. En cualquier caso, en los extractos crudos de las raíces de plantas cultivadas en amonio no se pudo detectar actividad NR.

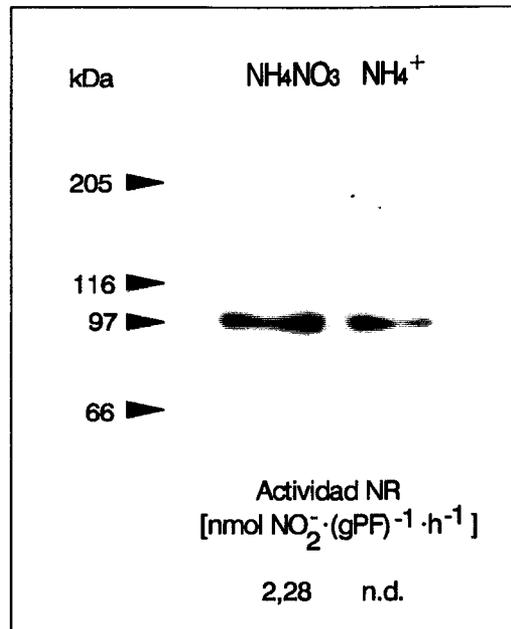


Fig. 42. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la NR en extractos crudos de raíces cultivadas en nitrato amónico o amonio. Se obtuvieron los extractos crudos (2 ml·gPF<sup>-1</sup>) de raíces de plantas de 30 trifolios cultivadas en nitrato amónico o cloruro amónico como fuentes de nitrógeno. 300 µg de proteína de los extractos fueron analizadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección en filtro con los antisueros obtenidos frente al péptido T-19-S de la NR de *L. japonicus*. Más detalles en *Materiales y Métodos*. (n.d.= no detectable).

Hemos examinado si en estos materiales podrían estar presentes los compuestos de tipo fenólico que hemos descrito en el apartado anterior. Se comparó la capacidad de inactivar a la NR por las fracciones 40-70% HMW y LMW de extractos de raíces de plantas cultivadas en semilleros en nitrato amónico o en amonio como fuentes de nitrógeno. Las plantas cultivadas en amonio o en nitrato amónico mostraban un desarrollo diferente en el mismo tiempo de cultivo, aunque florecían al mismo tiempo. Las plantas cultivadas en nitrato amónico florecían al cabo de aproximadamente 70 días después de la siembra. En este estado, las plantas presentaban numerosas ramas y alrededor de 100 trifolios. Las plantas cultivadas durante el mismo tiempo en presencia de amonio presentaban un desarrollo más limitado, con menor número de ramas y aproximadamente 30 trifolios. Hemos comparado la capacidad de las fracciones inactivantes obtenidas de raíces de plantas cultivadas en amonio (30 trifolios, 70 días de cultivo) y de plantas cultivadas en nitrato amónico (30 trifolios, 45 días de cultivo y 100 trifolios, 70 días de cultivo) de inactivar a la NR. Los resultados mostrados en la Fig. 43 indican un mayor grado de inactivación de la NR por las fracciones obtenidas a partir de los extractos crudos de raíces en amonio, sobre todo si se comparan con las

obtenidas de raíces de plantas con el mismo número de trifolios cultivadas en nitrato amónico.

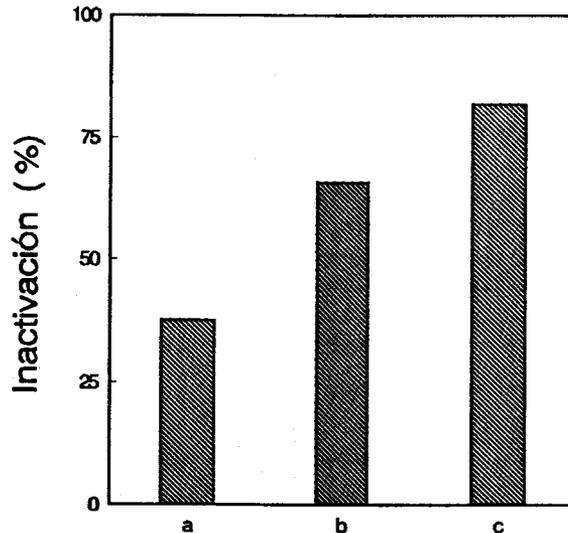


Fig. 43. Grado de inactivación de la NR producido por las fracciones 40-70% HMW y LMW de extractos crudos de raíces de plantas cultivadas en nitrato o amonio. Las fracciones 40-70% HMW y LMW fueron obtenidas a partir de extractos crudos de plantas cultivadas en nitrato amónico durante 40 (a) y 70 (b) días, o en amonio (c) durante 70 días, y que poseían, respectivamente, 30, 100 y 30 trifolios. 50  $\mu$ l de las fracciones 40-70% HMW y 175  $\mu$ l de las fracciones LMW se añadieron a 6,1 pkat de actividad NR (75  $\mu$ l de un precipitado 0-40% NR). Tras añadir los reactivos del ensayo se determinó la actividad NR que se muestra como porcentaje de inactivación en las incubaciones respecto al control en ausencia de los factores inactivantes y completado hasta 300  $\mu$ l con tampón de extracción ( $100\% = 0,293 \mu\text{mol NO}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) y la actividad en las incubaciones.

Cuando dichas fracciones eran obtenidas a partir de extractos crudos preparados en presencia de PVPP, se aliviaba el efecto inactivante de éstas sobre la NR presente en el precipitado 0-40% NR (Tabla 15). Sin embargo, no se consiguió detectar actividad NR en los extractos crudos de raíces de plantas cultivadas en amonio, aún en presencia de PVPP insoluble en la extracción. Estos resultados indican la acumulación de compuestos de naturaleza posiblemente fenólica en los extractos crudos de raíces de plantas cultivadas en amonio, que podrían responder de forma similar a las situaciones de estrés que se habían descrito en el apartado anterior.

Tabla. 15. Protección por PVPP añadido en la preparación del extracto crudo de la capacidad inactivante de las fracciones HMW y LMW de raíces de plantas de *L. japonicus* cultivadas en amonio (ausencia de nitrato).

Extracción	Sistema de incubación	Actividad NR (%)
	NR	100
- PVPP	NR + 40-70% HMW + LMW	22
+ PVPP	NR + 40-70% HMW + LMW	82

Se obtuvieron las fracciones 40-70% HMW y LMW a partir de extractos crudos ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces de plantas cultivadas en amonio, preparados en presencia o ausencia de PVPP al 3% (p/v). 50  $\mu\text{l}$  de las fracciones 40-70% HMW y 175  $\mu\text{l}$  de las fracciones LMW fueron añadidas a 13,66 pkat de actividad NR (75  $\mu\text{l}$  de un precipitado 0-40% NR, obtenido a partir de un extracto crudo ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) en ausencia de PVPP en la extracción). Tras la adición de los reactivos del ensayo, se determinó la actividad NR, que se expresa como porcentaje de la actividad sin adición de los factores inactivantes ( $0,656 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

En cualquier caso, la situación detectada en raíces de *L. japonicus* cultivadas en amonio resulta interesante en el sentido de que se detectan suficientes niveles de proteína pero nulos de actividad enzimática. En nuestro laboratorio se ha comprobado que la actividad enzimática se induce en esta planta al transferirlas desde amonio a nitrato amónico (A. Orea, comunicación personal). Estos resultados sugieren que en esta planta esta respuesta se da a muy bajas concentraciones de nitrato, pero que no son suficientes para conseguir la actividad (Fig. 44). Esto sugiere que el nitrato en esta planta podría ejercer también un control de tipo post-traduccionnal de los niveles de actividad NR. El control post-traduccionnal de la NR es un tema de particular interés en la actualidad (Daniel-Vedele y Caboche, 1996).

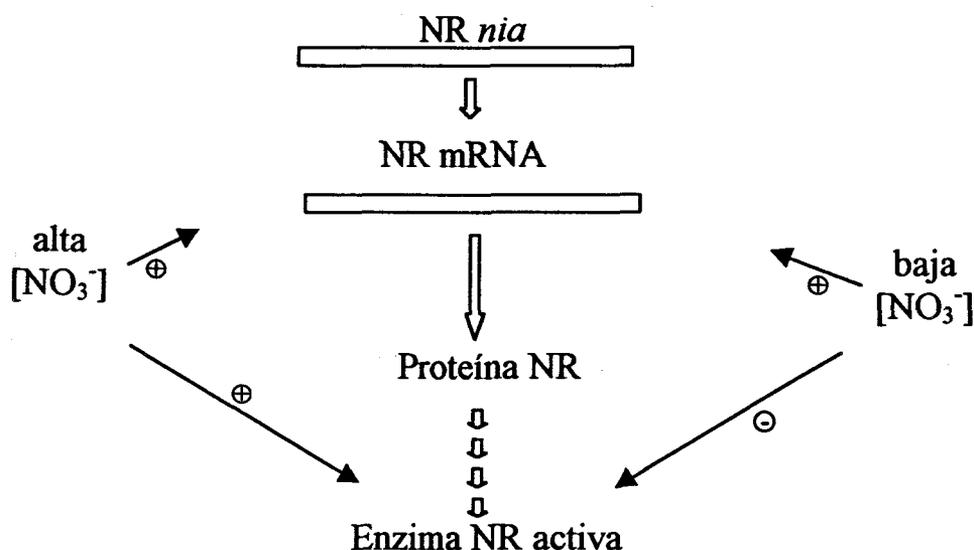


Fig. 44. Esquema propuesto del efecto diferencial de alta y baja concentración de nitrato sobre la expresión de la NR a nivel de proteína y actividad enzimática.

### 3. EXPRESIÓN DE LA NADH-NR EN HOJAS DE *Lotus japonicus*.

En la mayoría de las plantas, el nitrógeno en forma de nitrato es reducido más eficientemente en hojas que en raíces, debido a la disponibilidad inmediata en este tejido de fotoasimilados (carbono reducido, poder reductor y energía). Las leguminosas de las zonas templadas parecen ser una excepción, ya que en estas plantas el nitrato es fundamentalmente reducido en las raíces. El potencial de las leguminosas para reducir el nitrógeno en las raíces puede haberlas predispuesto para el desarrollo de relaciones de simbiosis con las especies de *Rhizobium* (Oaks, 1992). Hemos examinado la expresión de la NR en las hojas de *L. japonicus*, determinando los niveles de actividad enzimática y proteína, haciendo uso de los anticuerpos específicos anti-péptido de la NR.

Los niveles de proteína NR se analizaron mediante inmunodetección en filtro en las preparaciones de precipitados concentrados entre el 0-40% de sulfato amónico obtenidos a partir de extractos crudos de hojas y raíces. La Fig. 45 (a y b) muestra que el contenido de proteína NR en las preparaciones de hojas era similar al detectado en raíces. Sin embargo, cuando se examinó el contenido relativo de proteína mediante el mismo tipo de análisis pero directamente en los extractos crudos se pudo observar un nivel sustancialmente inferior de la proteína en los extractos de hojas (Fig. 45, c y d). Estas diferencias encontradas al analizar uno u otro tipo de preparaciones de ambos tejidos pensamos que se debe a la distinta proporción de la proteína total de los extractos que es precipitada entre el 0-40% de sulfato amónico y que podría modificar, por tanto, la proporción de NR en dichas preparaciones. Los niveles relativos de proteína NR detectados en los extractos crudos de hojas y raíces son consistentes con los niveles de mRNA de la NR determinados en ambos tejidos (Dr. Prosser, IACR-Long Ashton, Bristol, U.K., comunicación personal). Sin embargo, los niveles de actividad NR fueron indetectables en los extractos crudos de hojas, aunque éstos fueron preparados con PVPP insoluble en la extracción. Se ha examinado, por tanto, si estas discrepancias entre los niveles de proteína y actividad NR podrían estar relacionadas con la presencia de factores inactivantes de la NR en extractos crudos de hojas.

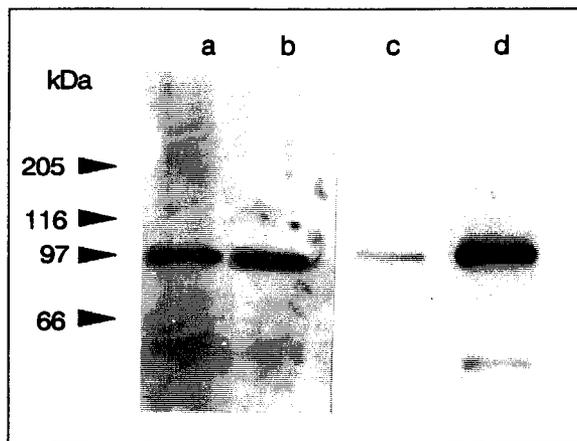


Fig. 45. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la NR en extractos crudos y precipitados 0-40% de sulfato amónico de hojas y raíces. Los extractos de hojas (c) y raíces (d) de plantas de 30 trifolios se obtuvieron en relación 2 ml·gPF<sup>-1</sup>, y se precipitaron entre el 0-40% de sulfato amónico. La proporción de proteína precipitada con respecto a la proteína en los extractos fue del 12% en hojas (a) y del 40% en raíces (b). 300 µl de proteína de los extractos y de los precipitados se analizaron mediante inmunodetección en filtro con los antisueros obtenidos frente al péptido T-19-S de la NR de *L. japonicus*.

### 3.1. Análisis de la presencia de factores inactivantes de la NADH-nitrato reductasa en extractos crudos de hojas de *L. japonicus*.

Al no detectarse actividad enzimática ni en presencia de EDTA ni de cationes Mg<sup>2+</sup> en el ensayo, dejamos al margen el estudio del mecanismo de fosforilación/defosforilación en hojas, y nos centramos en el análisis de factores inactivantes que se detectaran en presencia de EDTA (condición de máxima activación de la enzima por fosforilación/defosforilación).

La estrategia adoptada consistió en examinar el efecto de la adición de extractos crudos de hojas sobre la NR presente en los extractos crudos de raíces. La Fig. 46 A muestra la producción de nitrito durante el ensayo de un extracto crudo de raíces (control) y de la incubación del mismo con un extracto crudo de hojas preparado en el tampón estándar con PVPP insoluble en la extracción: la adición de tan sólo 5 µl del extracto crudo de hojas produjo un 53% de inhibición de la actividad NR a los 10 minutos del ensayo y del 77% a los 30 minutos de ensayo. Cuando los extractos de hojas y raíces fueron obtenidos en el mismo tampón suplementado con diferentes agentes protectores de la acción inactivante de los compuestos fenólicos (Sánchez y Harwood, 1992; Gray, 1978; Gegenheimer, 1990), el grado de inactivación seguía siendo del 84% a los 30 minutos de ensayo (Fig. 46 B). El menor grado de actividad NR incluso en el control en este caso posiblemente se deba al efecto inhibitor de alguno de los aditivos del tampón de extracción. La inactivación observada no se debía a la interferencia de algún componente del extracto de hojas con el método de determinación del nitrito (Tabla 16), ni a

que pudiera agotarse el NADH necesario para la reacción de la NR en el ensayo por la acción de deshidrogenasas (Tabla 17). Estos resultados sugieren la presencia de factores inactivantes de la NR en los extractos crudos de hojas, que parecen ser diferentes de los que hemos descrito en raíces.

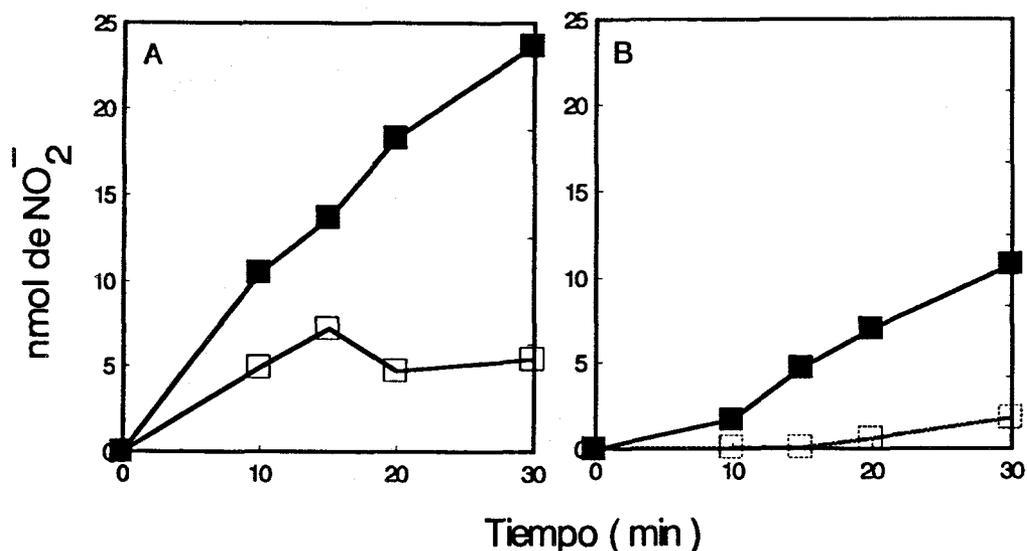


Fig. 46. Inactivación de la NR de un extracto crudo de raíces por la adición de extractos crudos alicuotas de hojas obtenidos en distintos tampones. El extracto crudo de raíces ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) fue obtenido en tampón estándar suplementado con PVPP insoluble ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ). Los extractos crudos de hojas ( $10 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) fueron obtenidos en el mismo tampón (A), o en éste suplementado con diferentes agentes protectores de fenoles (B): glicerol 10% (v/v), BSA 3% (p/v),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  10 mM, KCl 50 mM, ascorbato 0,2% (p/v), 2-mercaptoetanol 14 mM, DTE 2 mM, glutatión reducido 5 mM, Triton X-100 5 mM, poligalacturonato  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $\beta$ -ciclodextrina 0,5 mM, tropolona 0,2 mM, dietilditiocarbamato 0,2 mM, 2-mercaptobenzotiazol 0,2 mM. 5  $\mu\text{l}$  de los extractos de hojas fueron añadidos a 100  $\mu\text{l}$  de los extractos crudos de raíces, conteniendo 13,2 pkat de actividad NR ( $\square$ - $\square$ ). Como controles 100  $\mu\text{l}$  del extracto crudo de raíces se mezclaron con 5  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tampones usados para preparar los extractos de hojas ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ). El volumen se llevó hasta 300  $\mu\text{l}$  con el tampón de extracción estándar, completándose con los reactivos de ensayo para determinar la actividad NR, expresada como nmoles de  $\text{NO}_2^-$  producidos a distintos tiempos de ensayo.

Tabla 16. Incubación de cantidades crecientes de un extracto crudo de hojas con una cantidad fija de nitrito.

Incubación	$A_{540 \text{ nm}}$
10 $\mu\text{l}$ $\text{NO}_2\text{K}$ ( $0,12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	0,450
“ + 5 $\mu\text{l}$ Extracto crudo hojas	0,474
“ + 10 $\mu\text{l}$ Extracto crudo hojas	0,471
“ + 50 $\mu\text{l}$ Extracto crudo hojas	0,465

10  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{NO}_2\text{K}$  ( $0,12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) se mezclaron con cantidades crecientes de un extracto crudo de hojas ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ). Las mezclas se completaron hasta un volumen de 300  $\mu\text{l}$  con el tampón de extracción. A las incubaciones se les añadieron los reactivos del ensayo de actividad NR, añadiéndose a tiempo cero 50  $\mu\text{l}$  de acetato de zinc:PMS como se describe en *Materiales y Métodos*. Tras la incubación a

30°C durante 30 minutos se añadieron a las incubaciones los reactivos para la determinación del nitrito, determinándose la absorbancia a 540 nm.

Tabla. 17. Consumo de NADH en las incubaciones de extractos crudos de raíces con extractos crudos de hojas.

Incubación	A <sub>340 nm</sub>
100 µl EC raíces + 5 µl EC hojas (t <sub>0</sub> )	1,350
100 µl EC raíces + 5 µl EC hojas (t <sub>30</sub> )	1,115

100 µl de un extracto crudo de raíces (5 ml·gPF<sup>-1</sup>) se mezclaron con 5 µl de un extracto crudo de hojas (10 ml·gPF<sup>-1</sup>). El volumen se llevó a 300 µl con tampón de extracción, añadiéndose posteriormente los reactivos para el ensayo de la actividad de la NR. Se determinó la cantidad de NADH presente en las incubaciones midiendo la absorbancia a 340 nm al iniciarse la reacción (t<sub>0</sub>), y después de 30 minutos de incubación a 30°C (t<sub>30</sub>).

Para examinar la naturaleza de dichos factores se precipitó el extracto crudo de hojas con TCA, y el sobrenadante (neutralizado) se mezcló con el extracto crudo de raíces. Como puede verse en la Tabla 18, los extractos de hojas desproteinizados con TCA retenían la capacidad de inactivar a la NR de raíces. Los mismos resultados se obtuvieron al añadir al extracto crudo de raíces la fracción de componentes de bajo peso molecular (metabolitos) obtenida a partir del extracto crudo de hojas mediante filtración en un sistema AMICON (Tabla 18). Cuando al extracto crudo de raíces se le añadía el extracto de hojas previamente dializado, no se observaba la inactivación de la NR presente en el extracto crudo de raíces (Fig. 47). Estos datos sugieren que la inactivación está mediada por componentes de bajo peso molecular presentes en los extractos crudos de hojas. Sin embargo, una vez que la NR en los extractos crudos de raíces era inactivada por la adición del extracto crudo de hojas, la posterior diálisis no tenía efecto en revertir la inactivación (Tabla 19), sugiriendo una inactivación estable de la enzima por los componentes de bajo peso molecular presentes en los extractos crudos de hojas.

Tabla. 18. Inactivación de la NR de extractos crudos de raíces por componentes de bajo peso molecular presentes en los extractos crudos de hojas.

Incubación	Actividad NR (µmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·ml <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
100 µl EC raíces	0,273
100 µl EC raíces + 20 µl EC hojas	0,018
100 µl EC raíces + 20 µl LMW	0,021
100 µl EC raíces + 60 µl sobrenadante TCA	0,002

100  $\mu\text{l}$  de un extracto crudo de raíces ( $5 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ ) se mezclaron con 20  $\mu\text{l}$  de un extracto crudo de hojas ( $10 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ ), o bien con la misma cantidad de la fracción LMW obtenida a partir de éste en una unidad de filtración AMICON a través de una membrana de tamaño de exclusión Mr 10.000, ó con la cantidad correspondiente de la fracción soluble neutralizada derivada de la precipitación del extracto con TCA al 10% (p/v). El volumen de las mezclas anteriores se completó hasta 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción, añadiéndose posteriormente los reactivos del ensayo de actividad NR, que fue determinada tras 30 minutos de incubación a 30°C.

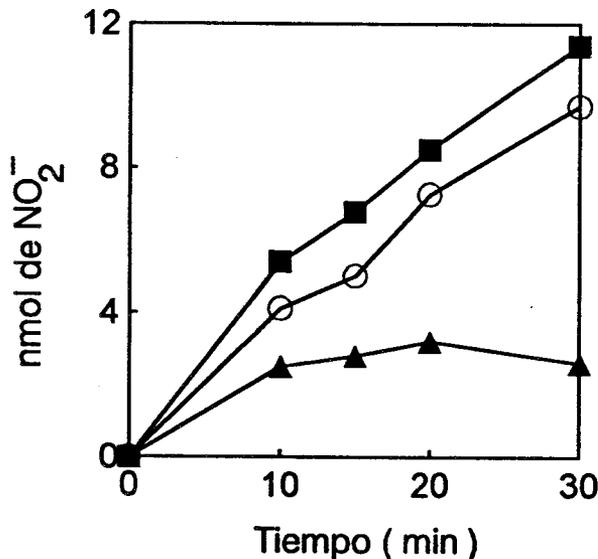


Fig. 47. Efecto de la diálisis del extracto crudo de hojas sobre la inactivación de la NR de un extracto crudo de raíces. El extracto crudo de hojas fue obtenido en relación  $10 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ . Una parte alícuota de 0,25 ml de extracto fue dializada a través de Sefadex G-25, eluyéndose el extracto dializado en un volumen final de 0,75 ml. A 7,1 pkat de actividad NR [100  $\mu\text{l}$  de un extracto crudo de raíces ( $5 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ )] se añadieron 5  $\mu\text{l}$  del extracto de hojas (▲), o una cantidad equivalente (15  $\mu\text{l}$ ) del extracto dializado (○). Los volúmenes de las respectivas incubaciones fueron completados hasta 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción, añadiéndose los reactivos del ensayo de actividad NR. La figura muestra la producción de  $\text{NO}_2^-$  (nmol) a distintos tiempos de ensayo de actividad en el control sin adición (■) y en las incubaciones anteriores.

Tabla. 19. Efecto de la diálisis sobre la inactivación de la NR en las incubaciones de extractos crudos de raíces previamente inactivada con extractos crudos de hojas.

Incubación	Actividad NR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
100 $\mu\text{l}$ EC raíces	0,320
100 $\mu\text{l}$ EC raíces + 5 $\mu\text{l}$ EC hojas	0,060
100 $\mu\text{l}$ EC raíces + 5 $\mu\text{l}$ EC hojas (incubación dializada)	0,090

A 8,89 pkat de actividad NR (100  $\mu\text{l}$  de un extracto crudo de raíces preparado en relación  $5 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ ) se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de un extracto crudo de hojas ( $10 \text{ ml}\cdot\text{gPF}^{-1}$ ). El volumen de la incubación se completó hasta 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción estándar. Una incubación paralela se dializó durante una hora en un sistema de microdiálisis a 4°C. Como control 100  $\mu\text{l}$  del extracto crudo de raíces se llevaron hasta 300  $\mu\text{l}$  con tampón de extracción. Todas las incubaciones se completaron con los reactivos del ensayo determinándose la actividad NR en cada una de ellas. La actividad en la incubación control mantenida a 4°C durante el tiempo que duró la diálisis fue de  $0,256 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Hemos investigado si estos componentes eran capaces de inactivar a la NR de otras fuentes biológicas vegetales. Para ello se comparó la capacidad de inactivar la NR de extractos crudos de raíces de *Lotus*, hojas de espinaca y de cebada obtenidas en el tampón estándar al incubarlos con extractos crudos de hojas de *Lotus*. La Fig. 48 muestra que se conseguía un grado similar de inactivación sobre la NR en todos los casos.

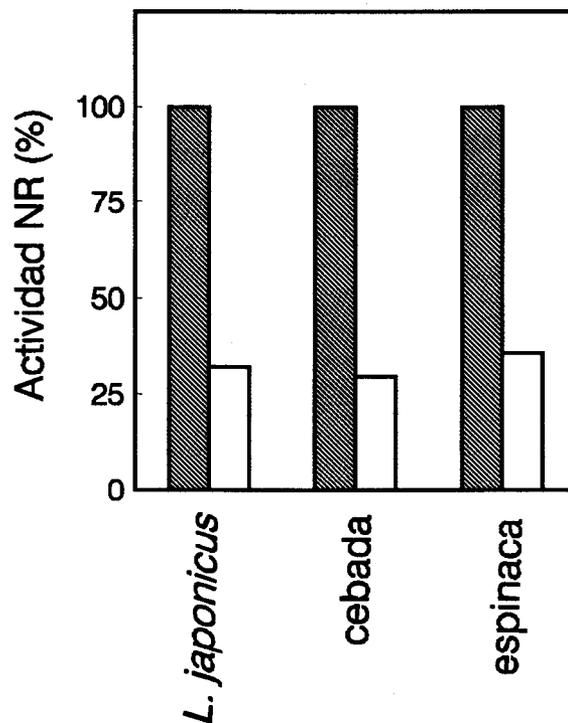


Fig. 48. Efecto de la adición del extracto crudo de hojas sobre la actividad NR de distintas plantas. Se obtuvieron extractos crudos de raíces de *L. japonicus* ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ), hojas de cebada ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) y hojas de espinaca ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) en tampón estándar como fuente de NR. Durante la extracción se añadió PVPP insoluble ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ). Por otra parte se preparó un extracto crudo de hojas de *L. japonicus* en el mismo tampón en relación  $10 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ .  $100 \mu\text{l}$  del extracto crudo de raíces de *L. japonicus* y  $50 \mu\text{l}$  de los extractos crudos de hojas de cebada y espinaca se mezclaron con  $5 \mu\text{l}$  del extracto crudo de hojas de *L. japonicus*. La actividad NR fue determinada en las incubaciones ( $\square$ ), y en el mismo volumen de cada uno de los extractos sin adición ( $\blacksquare$ ) tras completarse los volúmenes de las incubaciones hasta  $300 \mu\text{l}$  con tampón de extracción y después con los reactivos del ensayo. La actividad en las incubaciones se expresa como porcentaje de actividad en los controles: *L. japonicus*: 0,260; cebada: 1,08; espinaca:  $3,36 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Sin embargo, los niveles de actividad NiR y Fd-GOGAT en los extractos crudos de raíces de *L. japonicus* y en los extractos de hojas de espinaca y cebada no se veían significativamente afectados por la adición del

extracto crudo de hojas de *L. japonicus* (Fig. 49 A y B). Estos datos parecen indicar un efecto específico de los componentes inactivantes de bajo peso molecular de los extractos crudos de hojas de *L. japonicus* sobre la NR.

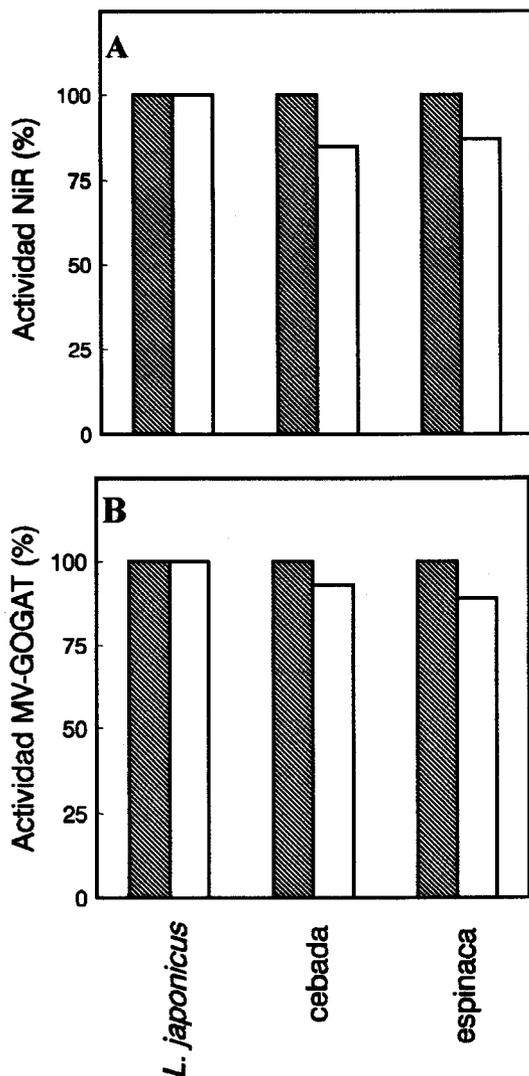


Fig. 49. Efecto de la adición del extracto crudo de hojas sobre la actividad MV-NiR y MV-GOGAT. (A) 200  $\mu$ l de los mismos extractos de la figura anterior se incubaron con 10  $\mu$ l del extracto crudo de hojas de *L. japonicus*. El volumen final se llevó hasta 1 ml con los reactivos del ensayo, determinándose la actividad NiR en las incubaciones (□), y en los mismos volúmenes de los extractos sin adición (▨). La actividad NiR en las incubaciones se expresa como porcentaje de la actividad en los controles tras 10 minutos de ensayo: *L. japonicus*: 40,8; cebada: 157; espinaca: 91,2  $\mu$ mol  $\text{NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . (B) 400  $\mu$ l de los extractos anteriores se mezclaron con 20  $\mu$ l del extracto crudo de hojas de *L. japonicus*. Se determinó la actividad MV-GOGAT en las incubaciones anteriores (□) y en los controles sin adición (▨). Los reactivos para la reacción MV-GOGAT fueron añadidos a las incubaciones, completando el volumen de ensayo hasta 2 ml. El 100% de actividad MV-GOGAT en los controles fue: *L. japonicus* 2,2; cebada 64,3; espinaca 75,2  $\mu$ moles glutamato- $\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 3.2. Expresión de la NADH-nitrato reductasa en plantas transgénicas de *L. japonicus* con expresión de la NADH-nitrato reductasa de espinaca bajo el promotor *cab*.

El uso de plantas transgénicas ha constituido una herramienta de gran utilidad para conocer a qué niveles es regulada la expresión de la NR en respuesta a distintos factores externos, como la luz y el nitrato, o internos, como ritmos endógenos circadianos y la disponibilidad de carbono reducido. La expresión del gen de la NR de tomate en plantas mutantes de *N. plumbaginifolia* deficientes en NR complementa la mutación, y es apropiadamente regulada en respuesta a la luz, nitrato y ritmo endógeno (Dorbe et al., 1992). La expresión de otros genes marcadores bajo los promotores de los genes de NR de *A. thaliana* en plantas transgénicas de tabaco ha llevado a identificar, mediante análisis de delección de la zona promotora, las regiones implicadas en la regulación de la enzima por nitrato (Lin et al., 1994). La utilización de plantas transgénicas transformadas con el gen de la NR bajo promotores constitutivos es un sistema muy apropiado para los estudios de regulación de la enzima a nivel transcripcional y post-transcripcional. Dadas las ventajas que ofrece *L. japonicus* como sistema de transformación, el grupo del laboratorio de Long Ashton (Bristol, U.K.) ha obtenido con este propósito plantas transgénicas transformadas con el gen de la NR de espinaca bajo el promotor *cab*.

Ya que en *L. japonicus* la asimilación de nitrato parece ser mayoritariamente en raíces, hemos examinado si la expresión de la NR de espinaca bajo el promotor *cab* en las hojas de las plantas transgénicas podía afectar los niveles de expresión de la NR de *L. japonicus* en raíces y hojas. Los niveles de proteína en los precipitados del 0-40% de sulfato amónico de los extractos de raíces y hojas fueron analizados mediante inmunodetección en filtro. La Fig. 50 muestra que existía un contenido similar de proteína NR en las raíces de las plantas silvestres y transgénicas. Los niveles de actividad NR en raíces, así como la sensibilidad de la enzima al  $Mg^{2+}$  se mostraron similares en ambos casos (Tabla 20), sugiriendo que la expresión de la enzima de espinaca en las hojas de las plantas transgénicas no afectaba la expresión de la enzima propia en raíces. Sin embargo, no pudimos detectar actividad enzimática alguna de la NR en hojas de las plantas transgénicas, al igual que ocurría en el tipo silvestre, ni en los extractos crudos de las hojas recogidas en la primera hora de la fase de luz (Tabla 20), ni en la penúltima hora de la fase de oscuridad del fotoperiodo.

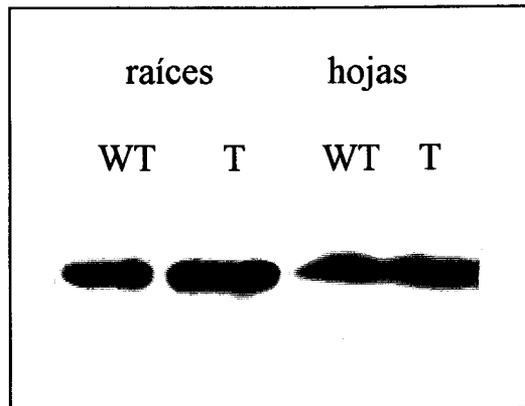


Fig. 50. Análisis mediante inmunodetección en filtro de la NR de *L. japonicus* en raíces y hojas de plantas silvestres y transgénicas. Se obtuvieron extractos crudos ( $2 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) de raíces y de hojas recogidas en la primera hora del periodo de luz, y se precipitaron entre el 0-40% de sulfato amónico. 300  $\mu\text{g}$  de los respectivos precipitados se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección en filtro con los antisueros obtenidos frente al péptido T-19-S de la NR de *L. japonicus*. La actividad NR en los extractos crudos de raíces de las plantas silvestres (WT) y transgénicas (T) fue de 0,49 y 0,69  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ , respectivamente.

Tabla. 20. Niveles de actividad NR en extractos crudos de raíces y de hojas de plantas silvestres y plantas transgénicas con expresión de la NR de espinaca bajo el promotor *cab*.

Material	Extracción y Ensayo	Actividad NR [ $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{gPF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]	Inhibición por $\text{Mg}^{2+}$ (%)
Raíces de plantas silvestres	EDTA	1,97	79,6
	$\text{MgCl}_2$	0,40	
Raíces de plantas transgénicas	EDTA	1,50	82,6
	$\text{MgCl}_2$	0,26	
Hojas de plantas silvestres	EDTA	n.d.	-
	$\text{MgCl}_2$	n.d.	
Hojas de plantas transgénicas	EDTA	n.d.	-
	$\text{MgCl}_2$	n.d.	

Las raíces y hojas de las plantas fueron recogidas en la primera hora de la fase de luz. Se obtuvieron extractos crudos ( $5 \text{ ml} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ) en tampón 100 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10  $\mu\text{M}$  FAD, 3% (p/v) BSA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, suplementado con 10 mM EDTA (extracción EDTA) ó 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (extracción  $\text{MgCl}_2$ ). En las extracciones se añadió PVPP insoluble ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{gPF}^{-1}$ ). 150  $\mu\text{l}$  de cada extracto se añadieron a los reactivos del ensayo (b) descrito en *Materiales y Métodos*, y se determinó la actividad NR tras 15 minutos de incubación de los ensayos a 30°C. El nivel de inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  en los extractos se calculó según ha sido referido por MacKintosh et al. (1995). (n.d. no detectable).

Como en el caso de las plantas silvestres, la adición de extractos crudos de hojas de las plantas transgénicas a extractos crudos de raíces inhibió la actividad NR presente en estos últimos (no mostrado). Los niveles indetectables de actividad NR de espinaca en las hojas de las plantas transgénicas podrían deberse al efecto inactivante de los componentes de bajo peso molecular que hemos descrito anteriormente, ya que éstos vimos que eran capaces de inactivar a la NR en extractos crudos de hojas de espinaca, como se ha mostrado en el apartado anterior.

Los resultados anteriores sugieren una notable diferencia en los niveles de expresión de la NR en raíces y hojas de *L. japonicus*. Esta planta pertenecería al grupo de leguminosas de climas templados que asimilan mayoritariamente en raíces. Aunque el nivel de proteína NR era claramente detectable en hojas, la actividad enzimática resultó ser indetectable. Esto pensamos que puede ser debido a la presencia de componentes de bajo peso molecular en los extractos crudos de hojas, que parecen inactivar específicamente a la NR. Sin embargo no sabemos si esta situación se produce exclusivamente *in vitro* o si también podría tener lugar *in vivo*. Desgraciadamente, no ha podido determinarse repetitivamente actividad NR *in situ* en hojas de *L. japonicus* por los distintos métodos descritos (Guerrero, 1982; Mauriño et al., 1986; Woodall, 1994), aunque este dato no lo tenemos en cuenta para darle validez a la conclusión de que la actividad enzimática está inhibida *in vivo*, puesto que es también altamente difícil detectar la actividad NR *in vivo* con los mismos métodos en raíces.

Los factores inactivantes de la NR presentes en los extractos crudos de hojas parecen no estar relacionados, o al menos no ser del mismo tipo que los compuestos de tipo fenólico que hemos descrito que se acumulan en raíces, ya que no son excluidos con PVPP o agentes reductores u otros protectores que reducen la acción de estos compuestos en los extractos. Dirr et al. (1973) refirieron la presencia de compuestos fenólicos en extractos crudos de hojas de varias especies de ericáceas, cuyo efecto inactivante sobre la NR y otras enzimas no podía ser excluido en presencia de PVPP. Dichos compuestos no eran dializables y su efecto sí se protegía con polyclar-AT, con lo que concluyeron que se trataba de compuestos de alto peso molecular del tipo de taninos condensados o hidrolizables. Los factores inactivantes que hemos descrito en los extractos de hojas de *L. japonicus* son de bajo peso molecular y parecen tener un efecto específico sobre la NR, con lo que muestran también diferencias con los descritos en los extractos de hojas de ericáceas.

Aunque se han descrito mecanismos de inactivación de la NR que implican la participación de diferentes tipos de proteínas inactivadoras (sistema de fosforilación reversible mediado por quinasa, endopeptidasas, proteínas que inactivan a la NR reversible o irreversiblemente sin implicar la proteólisis de la enzima) la inactivación de la NR por compuestos de bajo peso molecular ha sido poco referida. En *Chlorella*, Losada et al. (1970) describieron la inactivación reversible de la NR en células cultivadas en amonio. Este mecanismo de inactivación parece guardar relación con la inactivación *in vitro* posteriormente bien caracterizada de la enzima de distintas algas por NADH y bajas concentraciones de cianuro u O<sub>2</sub> en ausencia de nitrato (Solomonson y Vennesland, 1972; de la Rosa, 1983). Aunque la forma inactiva de la NR ha sido descrita en otros organismos fotosintéticos y plantas (Solomonson y Barber, 1990), no se ha conseguido purificar a partir de éstos un complejo inactivo NR-cianuro como en el caso de *Chlorella* (Lorimer et al., 1974). La inactivación de la NR por los compuestos de bajo peso molecular presentes en los extractos crudos de hojas de *L. japonicus* no parece guardar relación con este mecanismo, ya que se observa en condiciones muy distintas de las descritas en *Chlorella*.

Recientemente en nuestro laboratorio hemos observado que la inactivación de la NR en los extractos crudos de raíces por la adición de extractos crudos de hojas se protegía en un 40% por la presencia de fosfato inorgánico en los ensayos (A. Orea, comunicación personal). En el mecanismo de fosforilación reversible de la enzima NR de espinaca se ha referido la reactivación de NR por fosfato inorgánico (Huber et al., 1992; Huber y Huber, 1995). No obstante pensamos que es difícil que la inactivación que nosotros hemos descrito por componentes de bajo peso molecular tuviera relación con dicho mecanismo, ya que en nuestras condiciones de ensayo, en ausencia de fosfato y en presencia de EDTA, no debería observarse inactivación de la NR de acuerdo con los modelos propuestos.

En cualquier caso sí resulta interesante que en la regulación por interconversión por fosforilación los elementos clave que se modulan, y dispara la regulación son componentes de bajo peso molecular (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, etc.) ya que los niveles de las proteínas participantes (quinasas, NIP, fosfatasas) se ha descrito que son bastante constitutivas, estando incluso presentes en situaciones donde no hay proteína NR (Glaab y Kaiser, 1996). Nuevos trabajos están en marcha en nuestro laboratorio para tratar de identificar la naturaleza de los componentes inactivantes encontrados, y si guardan alguna conexión con el mecanismo de fosforilación reversible, para lo cual sería preciso nuevos elementos que puedan explicar estos resultados.

## ***CONCLUSIONES***

En este trabajo se han estudiado dos aspectos relacionados con la expresión de enzimas de la asimilación de nitrógeno en plantas superiores. Por un lado la regulación de la expresión de la Fd-GOGAT de cebada, y, por otro, la expresión de la NR de la leguminosa modelo *L. japonicus*.

En relación con la Fd-GOGAT de cebada se ha encontrado lo siguiente:

1. La Fd-GOGAT se expresa tanto en hojas como en raíces de cebada, si bien el nivel de expresión es cinco veces menor en raíces que en hojas en términos de proteína total. La enzima de hojas y raíces son proteínas antigénicamente muy similares, y son susceptibles de degradación proteolítica en extractos crudos a fragmentos de 69 y 96 kDa. La proteólisis de la Fd-GOGAT se ha comprobado que afecta a la actividad dependiente de ferredoxina, pero no a la que utiliza metil viológeno reducido.
2. Además de la regulación por diferenciación de órgano, la expresión de la Fd-GOGAT en cebada está afectada por factores como la luz, el nitrógeno exógeno y el desarrollo. Aunque la luz y el nitrógeno exógeno en plantas desprovistas de los mismos producen una estimulación de 2 a 3 veces en los niveles de proteína y actividad enzimática, ninguno de estos factores son requisitos indispensables para la expresión de la Fd-GOGAT, ya que niveles constitutivos sustanciales de actividad enzimática y proteína están presentes en plantas etioladas, plantas verdes adaptadas a prolongados periodos de oscuridad, así como en plantas sometidas a carencia de nitrógeno exógeno.
3. En cuanto al desarrollo, la Fd-GOGAT comienza a ser detectable a nivel de actividad enzimática y proteína a partir de los 4 días después de la siembra. En un solo día experimenta un aumento de 30 veces, coincidente con la expansión de la primera hoja. El nivel de Fd-GOGAT se hace máximo entre los días 9 y 10 a partir de la siembra, y después disminuye. La determinación de los niveles de Fd-GOGAT en distintas hojas de la planta apoya también la existencia de una clara influencia de la edad/desarrollo en los niveles de Fd-GOGAT. Pensamos que estos cambios en los niveles de Fd-GOGAT deben estar relacionados con cambios en la traslocación de metabolitos nitrogenados, fundamentalmente glutamina, desde las partes maduras a las partes jóvenes de la planta. Este y los mecanismos de regulación antes mencionados operan a nivel transcripcional, si bien se presentan algunos indicios de que procesos post-transcripcionales son también de importancia.

4. Se han analizado a nivel de mRNA y proteína una serie de mutantes fotorrespiratorios deficientes en la actividad Fd-GOGAT. Los mutantes RPr 82/9 y RPr 84/82 están afectados a nivel traduccional o post-traduccional, mientras que los mutantes RPr 82/1 y RPr 84/42 lo están en el inicio/terminación de la transcripción o bien en el procesamiento del mRNA, indicando la importancia de todos estos procesos en la regulación de la expresión de esta enzima.

En relación con los estudios de la NR de *L. japonicus*, los resultados obtenidos nos llevan a las siguientes conclusiones:

1. Se ha observado una influencia de la edad y/o condiciones de cultivo en los niveles de nitrato y proteína/actividad NR en extractos crudos de raíces de *L. japonicus*, comprobándose una disminución de dichos parámetros durante el crecimiento provocada por la limitación de espacio para el desarrollo de la raíz. Esta disminución es más acentuada a nivel de actividad enzimática que de proteína NR, lo que ha dado pie a investigar la presencia de posibles factores inactivantes de la NR en esta planta.
2. En relación con el mecanismo de inactivación reversible de la NR por fosforilación/defosforilación hemos encontrado que la NR en extractos crudos de raíces de *L. japonicus* está en un estado fuertemente inactivado, como se demuestra por el alto grado de inhibición por  $Mg^{2+}$  de la actividad. La enzima puede ser reactivada *in vitro* por la presencia conjunta de EDTA en exceso y AMP, indicando la operatividad de este mecanismo. Sin embargo, el grado de inhibición por  $Mg^{2+}$  no varía sustancialmente en respuesta a transiciones luz/oscuridad, ni durante el crecimiento de la planta.
3. Se ha examinado la presencia de otro tipo de factores inactivantes en extractos crudos de raíces de *L. japonicus*, encontrándose que componentes de alto y bajo peso molecular de carácter fenólico se acumulan en las raíces en estados más maduros del crecimiento en respuesta a las situaciones de estrés relacionadas con la limitación de espacio.
4. Las plantas de *L. japonicus* cultivadas en amonio como única fuente de nitrógeno carecen de actividad enzimática NR detectable en extractos crudos de raíces, si bien se ha comprobado la presencia de proteína NR, con lo que debe estar operando algún mecanismo de regulación post-traduccional en estas condiciones. Los componentes fenólicos antes mencionados también se acumulan en esta situación, pero la actividad

enzimática no logra detectarse incluso en condiciones donde se protege de la acción de dichos compuestos.

5. En los extractos crudos de hojas de *L. japonicus* puede detectarse la proteína NR, aunque la actividad enzimática resulta indetectable incluso en unas condiciones similares a las que permite detectar máximos de actividad en otros organismos. Se ha comprobado en hojas la presencia de componentes de bajo peso molecular, de naturaleza distinta a los que se acumulan en raíces, que inactivan a la NR de raíces de esta planta así como de distintas fuentes vegetales de manera estable y específica. Estos componentes también están presentes en los extractos crudos de hojas de plantas transgénicas de *L. japonicus* con expresión de la NR de espinaca bajo el promotor *cab*, donde tampoco se ha detectado la actividad enzimática.

## ***BIBLIOGRAFIA***

Anderson, M.P.; Vance, C.P.; Heichel, G.H.; Miller, S.S. (1989). Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.*, **90**, 351-358.

Andrews, M. (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.*, **9**, 511-519.

Aslam, M.; Oaks, A.; Huffaker, R.C. (1976). Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.*, **58**, 588-591.

Avila, C.; Márquez, A.J.; Pajuelo, P.; Cannell, M.E.; Wallsgrave, R.M.; Forde, B.G. (1993). Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta*, **189**, 475-483.

Bachmann, M.; Huber, J.L.; Athwal, G.S.; Wu, K.; Ferl, R.J.; Huber, S.C. (1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS letters*, **398**, 26-30.

Bachmann, M.; McMichael, R.W.; Huber, J.L.; Kaiser, W.M.; Huber, S.C. (1995). Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant Physiol.*, **108**, 1083-1091.

Batt, R. y Wallace, W. (1989). Characteristics of the active site and substrate specificity of a maize root endopeptidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **990**, 109-112.

Becker, T.W.; Nef-Campa, C.; Zehnacker, C.; Hirel, B. (1993). Implication of the phytochrome in light regulation of the tomato gene(s) encoding ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Physiol. Biochem.*, **31**, 725-729.

Bergareche, C.; Ayuso, R.; Masgrau, C.; Simón, E. (1994). Nitrate reductase in cotyledons of cucumber seedlings as affected by nitrate, phytochrome and calcium. *Physiol. Plant.*, **91**, 257-262.

Bernhard, W.R. y Matile, P. (1994). Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant Sci.*, **98**, 7-14.

Blackwell, R.D.; Murray, A.J.S.; Lea, P.J.; Joy, K.W. (1988a). Sucrose synthesis and N metabolism in a photorespiratory mutant of barley deficient in both chloroplastic glutamine synthetase and glutamate synthase. *J. Exp. Botany*, **39**, 845-858.

Blackwell, R.D.; Murray, A.J.S.; Lea, P.J.; Joy, K.W. (1988b). Photorespiratory amino donors, sucrose synthesis and the induction of CO<sub>2</sub> fixation in barley deficient in glutamine synthetase and/or glutamate synthase. *J. Exp. Bot.*, **38**, 1799-1809.



- Blacwell, R.D.; Murray, A.J.S.; Joy, K.W.; Lea, P.J. (1987). **Inhibition of photosynthesis in barley with decreased levels of chloroplastic glutamine synthetase.** *J. Exp. Bot.*, **38**, 1799-1809.
- Botrel, A.; Magné, C.; Kaiser, W.M. (1996). **Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia.** *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 645-652.
- Bowsher, C.G.; Boulton, E.L.; Rose, J.; Nayagam, S.; Emes, M.J. (1992). **Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non photosynthetic root plastids.** *Plant J.*, **2** (6), 893-898.
- Bowsher, C.G.; Hucklesby, D.P.; Emes, M.J. (1989). **Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum*.** *Planta*, **177**, 359-366.
- Bowsher, C.G.; Long, D.M.; Oaks, A.; Rothstein, S.J. (1991). **Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots.** *Plant Physiol.*, **95**, 281-285.
- Bradford, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brears, T.; Walker, E.L.; Coruzzi, G.M. (1991). **A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase GS3A gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa.** *Plant J.*, **1**, 235-244.
- Caboche, M.; Rouzé, P. (1990). **Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants.** *Trends in Genetics.*, **6**, 187-192.
- Campbell, W.H. (1996). **Nitrate reductase Biochemistry comes of age.** *Plant Physiol.*, **111**, 355-361.
- Campbell, W.H.; Kinghorn, J.R. (1990). **Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases.** *Trend Biochem. Sci.*, **15**, 315-319.
- Carvalho, H.; Pereira, S.; Sunkel, C.; Salema, R. (1992). **Detection of cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods.** *Plant Physiol.*, **100**, 1591-1594.
- Cataldo, D.A.; Haroon, M.; Schrader, L.E.; Youngs, V.L. (1975). **Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid.** *Comm. Soil Sci. Plant Analysis*, **6** (1), 71-80.
- Champigny, M.L. (1995). **Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants.** *Photosyn. Res.*, **46**, 117-127.
- Cheng, C.L.; Dewdney, J.; Nam, H.G.; Den Boer, B.G.W.; Goodman, H.M. (1988). **A new locus (*NIA 1*) in *Arabidopsis thaliana* encoding nitrate reductase.** *EMBO J.*, **7**, 3309-3314.

- Cheng, F.L. y Cullimore, J.V. (1988). **Two iso-enzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris***. *Plant Physiol.*, **88**, 1411-1417.
- Chomcczynsky, P. y Sacchi, N. (1987). **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Cincerová, A. (1987). **Ferredoxin-dependent glutamate synthase activity dduring the first developmental stages of wheat plants as affected by calcium deficiency**. *Biol. Plant. (Praha)*, **29 (1)**, 38-44.
- Crawford, N.M. (1995). **Nitrate: nutrient and signal for plant growth**. *Plant Cell*, **7**, 859-868.
- Crawford, N.M. y Arst, H.N. Jr. (1993). **The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants**. *Ann. Rev. Genet.*, **27**, 115-146.
- Daniel-Vedele, F. y Caboche, M. (1996). **Molecular analysis of nitrate assimilation in higher plants**. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, **319**, 961-968.
- de Cires, A.; de la Torre A., Delgado, A.; Lara, C. (1993a). **Role of light and CO<sub>2</sub> fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves**. *Planta*, **190**, 277-283.
- de Cires, A.; de la Torre, A.; Lara, C. (1993b). **Involvement of CO<sub>2</sub> fixation products in the light-dark modulation of nitrate reductase activiyy in barley leaves**. *Physiol. Plant.*, **89**, 577-581.
- de la Rosa, M.A. (1983). **Assimilatory nitrate reductase from the green alga *Ankistrodesmus braunii***. *Mol. Cell. Chem.*, **50**, 65-74.
- Dirr, M.A.; Barker, A.V.; Maynard, D.N. (1973). **Extraction of nitrate reductase from leaves of ericaceae**. *Phytochem.*, **12**, 1261-1264.
- Dorbe, M.F.; Caboche, M.; Daniel-Vedele, F. (1992). **The tomato *nia* gene complements a *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutant and is properly regulated**. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 363-375.
- Douglas, P.; Morrice, N.; Mackintosh, C. (1995). **Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves**. *FEBS Letters*, **377**, 113-117.
- Edwards, J.W. y Coruzzi, G.M. (1989). **Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase**. *Plant Cell*, **1**, 241-248.
- Edwards, J.W.; Walker, E.L.; Coruzzi, G.M. (1990). **Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3459-3463.

- Elmlinger, M.W. y Mohr, H. (1991). Coaction of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling the appearance of ferredoxin-dependent glutamate synthase in the scots pine (*Pinus sylvestris*) seedling. *Planta*, 183, 374-380.
- Emes, M.J. y Tobin, A.K. (1991). Control of metabolism and development in higher plant plastids. *Int. Rev. Cytol.*, 145, 149-216.
- Fedorova, E.; Grennwood, J.S.; Oaks, A. (1994). *In situ* localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta*, 194, 279-286.
- Feinberg, A.P.; Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6-13.
- Fernández-Conde, M.E.; de la Haba, P.; Maldonado, J.M. (1995). Rhythmic variations of ferredoxin-glutamate synthase activity in sunflower (*Heliantus annuus*) leaves. *J. Plant Physiol.*, 145, 682-685.
- Forde, B.G.; Cullimore, J.V. (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. En *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* ( B.J. Mifflin, Ed.), Vol. 6, Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 247-296
- Forde, B.G.; Day, H.M.; Turton, J.F.; Shen, W.J.; Cullimore, J.V.; Oliver, J.E. (1989). Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. displays contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell*, 1, 391-401.
- Freeman, J.; Márquez, A.J.; Wallsgrove, R.M.; Saarelainen, R.; Forde, B.G. (1990). Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.*, 14, 297-311.
- Friedman, M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1523-1540.
- Friedrich, J.W.; Huffaker, R.C. (1980). Photosynthesis, leaf resistance, and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing leaves. *Plant Physiol.*, 65, 1103-1107.
- Gallon, J.R.; Chaplin, E. (1987). An introduction on nitrogen fixation. Cassell Press.
- Galván, F.; Márquez, A.J.; Vega, J.M. (1985). Physicochemical properties of ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.*, 40c, 373-378.
- García-Gutiérrez, A.; Cantón, F.R.; Gallardo, F.; Sánchez-Jiménez, F.; Cánovas, F.M. (1995). Expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase in dark-grown seedlings. *Plant Mol. Biol.*, 27, 115-128.
- Gegenheimer, P. (1990). Guide to Protein Purification. En *Methods in Enzymology*, (M.D. Deustscher, Ed.), Vol. 182, Academic Press, San Diego, California, pp. 174-193.

- Glaab, J. y Kaiser, W.M. (1993). **Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots.** *Planta*, **191**, 173-179.
- Glaab, J. y Kaiser, W.M. (1995). **Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent "binding" of an inhibitor protein.** *Planta*, **195**, 514-518.
- Gray, J.C. (1978). **Absorption of polyphenols by polyvinylpyrrolidone and polystyrene resins.** *Phytochem.*, **17**, 495-497.
- Green, L.S.; Yee, B.C.; Buchanan, B.; Kamide, K.; Samada, Y.; Wada, K. (1991). **Ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase from photosynthetic and non photosynthetic tissues of tomato.** *Plant Physiol.*, **96**, 1207-1213.
- Gregerson, R.G.; Miller, S.S.; Twary, S.N.; Gantt, J.S.; Vance, C.P. (1993). **Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules.** *Plant Cell*, **5**, 215-226.
- Guerrero, M.G.; Vega, J.M.; Losada, M. (1981). **The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation.** *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 169-204.
- Guerrero, M.G. (1982). **Assimilatory nitrate reduction.** En *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis* (J. Coombs y D.O. Hall, Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 124-130.
- Gupta, S.C. y Beevers, L. (1984). **Synthesis and degradation of nitrite reductase in pea leaves.** *Plant Physiol.*, **75**, 251-252.
- Gupta, S.C.; Beevers, L. (1987). **Regulation of nitrite reductase, cell-free translation and processing.** *Plant Physiol.*, **83**, 750-754.
- Hamano, T.; Oji, Y.; Okamoto, S.; Mitsuhashi, Y.; Matsuki, Y. (1983). **A nitrate reductase inactivating factor from barley (*Hordeum distichum* L.) leaves.** *Plant Cell Physiol.*, **21**(7), 1337-1341.
- Handberg, K. y Stougaard, J. (1992). ***Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics.** *Plant J.*, **2** (4), 487-496.
- Hayakawa, T.; Nakamura, T.; Hattori, F.; Mae, F.; Ojima, K.; Yamaya, T. (1994). **Cellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants.** *Planta*, **193**, 455-460.
- Hecht, U.; Oelmüller, R.; Mohr, H. (1988) **Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings.** *Planta*, **175**, 130-138.
- Hensel, L.L.; Crbic, V.; Baumgarten, D.A.; Bleecker, A.B. (1983). **Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*, **5**, 553-564.

- Hirasawa, M.; Hurley, J.K.; Tollin, G.; Knaff, D.B. (1996). Redox and kinetics studies of spinach glutamate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **330**, 209-215.
- 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.
- House, C.M. y Anderson, J.W. (1980). Light dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C4-dicarboxylic acids. *Phytochem.*, **19**, 1925-1930.
- Huber, J.L.; Huber, S.C.; Campbell, W.H.; Redinbaugh, M.C. (1992). Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296** (1), 58-65.
- Huber, J.L.; Redinbaugh, M.G.; Huber, S.C.; Campbell, H. (1994a). Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. *Plant Physiol.*, **106**, 1667-1674.
- Huber, S.C. y Huber, J.L. (1995). Metabolic activators of spinach leaf nitrate reductase: Effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta*, **196**, 180-189.
- Huber, S.C.; Huber, J.L.; McMichael, R.W. (1994b). Control of plant enzymes activity by reversible protein phosphorylation. *Int. Rev. Cytol.*, **149**, 47-98.
- Jepson, I.; Bray, J.; Jenkins, G.; Schuch, W.; Edwards, K. (1991). A rapid procedure for the construction of PCR cDNA libraries from small amounts of plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **9** (2), 131-138.
- Jiang, Q. y Gresshoff, P.M. (1997). Classical and Molecular Genetics of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**, 59-68.
- Kaiser, W.M. y Huber, S. (1994). Modulation of nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free  $Mg^{2+}$  and 5'-AMP. *Planta*, **193**, 358-364.
- Kaiser, W.M.; Spill, D.; Brendle-Behnisch, E. (1992). Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase. *Planta*, **186**, 236-240.
- Kamachi, K.; Yamaya, T.; Hayakawa, T.; Mae, T.; Ojima, K. (1992). Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol.*, **96**, 411-417.
- Kamachi, K.; Yamaya, T.; Mae, T.; Ojima, K. (1991). A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.*, **96**, 411-417.

- Kar, M. y Feierabend, J. (1984). **Changes in the activities of enzymes involved in amino acid metabolism during the senescence of detached wheat leaves.** *Physiol. Plant*, **62**, 39-44.
- Kawakami, N. y Watanabe, A. (1988a). **Change in gene expression in radish cotyledons during dark-induced senescence.** *Plant Cell Physiol.*, **29**, 347-353.
- Kawakami, N.; Watanabe, A. (1988b). **Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledons.** *Plant Physiol.*, **88**, 1430-1434.
- Kendall, A.C.; Wallsgrave, R.M.; Hall, N.P.; Turner, J.C.; Lea, P.J. (1986). **Carbon and nitrogen metabolism in barley mutants lacking ferredoxin dependent glutamate synthase.** *Planta*, **168**, 316-323.
- Keys, A.J.; Bird I.F.; Cornelius, M.J.; Lea, P.J.; Wallsgrave, R.M.; Mifflin, B.J. (1978). **Photorespiratory nitrogen cycle.** *Nature*, **275**, 741-743.
- Kleinhofs, A. y Warner, R.L. (1990). **Advances in nitrate assimilation.** En *The Biochemistry of Plants*, (B.J. Mifflin, P.J. Lea, Eds.), Vol. 16, Academic Press. New York, pp 89-119.
- Kleinhofs, A.; Warner, R.; Lawrence, J.; Melzer, J.; Jeter, J.; Kudrna, D. (1989). **Molecular genetics of nitrate reductase in barley.** En *Molecular and Genetics Aspects of Nitrate Assimilation*. (J. Wray y J. Kinghorn, Eds), pp 197-211.
- Knaff, D.B.; Hirasawa, M.; Ameyibor, E.; Fu, W.; Johnson, M. (1991). **Spectroscopic evidence for a [3Fe-4S] cluster in spinach glutamate synthase.** *J. Biol. Chem.*, **266**, 15080-15084.
- Kojima, M.; Wu, S.J.; Sugimoto, T.; Nanmori, T.; Oji, Y. (1994). **phosphorylation/dephosphorylation of komatsuna (*Brassica campestris*) leaf nitrate reductase in vivo and in vitro in response to environmental light conditions: Effects of protein kinase and protein phosphatase inhibitors.** *Physiol. Plant.*, **93**, 139-145.
- LaBrie, S.T.; Crawford, N.M. (1994). **A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of nitrate reductase reduces both activity and phosphorylation levels in Arabidopsis.** *J. Biol. Chem.*, **296**, 14497-14501.
- Laemli, U.K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, **251**, 614-616.
- Lam, H.M.; Coschigano, K.T.; Oliveira, I.C.; Melo-Oliveira, R, Coruzzi, G.M. (1996). **The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants.** *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 569-593.
- Lam, H.M.; Coschigano, K.T.; Schultz, C.; Melo-Oliveira, R.; Tjaden, G.; Oliveira, I.; Ngai, N.; Hsieh, M.H.; Coruzzi, G. (1995). **Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis.** *Plant Cell.*, **7**, 887-898.

- Lara, M.; Cullimore, J.V.; Lea, P.J.; Miflin, B.J.; Johnston, A.W.B; Lamb, J.W. (1983). **Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L.** *Planta*, **157**, 254-258.
- Larsson, C.M. y Ingemarsson, B. (1989). **Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants.** En *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* (J.L. Wray y J.R. Kinghorn, Eds.) Oxford Science Publications, pp. 3-14.
- Lea, P.J. y Forde, B.G. (1994). **The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism.** *Plant Cell Environ.*, **17**, 541-556.
- Lea, P.J.; Blackwell, R.D.; Joy, K.W. (1992). **Ammonia assimilation.** En *Nitrogen Metabolism in Plants* (K. Mengel y D.J. Pillbeam, Eds.) Clarendon Press, Oxford. pp. 153-186.
- Lea, P.J.; Miflin, B.J. (1974). **An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants.** *Nature*, **251**, 614-616.
- Lea, P.J.; Robinson, S.A.; Stewart, G.R. (1990). **The enzymology and Metabolism of glutamine, glutamate and asparagine.** En *The Biochemistry of Plants*, Vol. 16, (B.J. Miflin, P.J. Lea, Eds), Academic Press, New York, pp 121-159.
- León, H.; de la Haba, P.; Maldonado, J.M. (1990). **Changes in the levels of enzymes involved in ammonia assimilation during the development of *Phaseolus vulgaris* seedlings. Effects of exogenous ammonia.** *Physiol. Plant.*, **80**, 20-26.
- Lillo, C. (1993). **Magnesium and calcium inhibition of squash NADH nitrate reductase.** *Plant Cell Physiol.*, **34**, 1181-1185.
- Lin, Y.; Hwang, C.F.; Brown, J.B.; Cheng, C.L. (1994). **5' Proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco.** *Plant Physiol.*, **106**, 477-484.
- Lorimer, G.H.; Gewitz, H.S.; Volker, W.; Solomonson, L.P.; Vennesland, B. (1974). **The presence of bound cyanide in the naturally inactivated form of nitrate reductase of *Chlorella*.** *J. Biol. Chem.*, **249**, 6074-6079.
- Losada, M.; Paneque, A.; Aparicio, P.J.; Vega, J.M.; Cárdenas, J.; Herrera, J. (1970). **Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in *Chlorella*.** *J. Biol. Chem.*, **249**, 6074-6079.
- Mackintosh, C. (1992). **Regulation of spinach leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation.** *Biochem. Biophys. Acta*, **1137**, 121-126.
- Mackintosh, C. (1997). **Regulation of C/N metabolism by reversible protein phosphorylation.** En *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*. (C.H. Foyer y W.P. Quick, Eds.), Taylor & Francis Ltd, London, pp. 179-201.

- Mackintosh, C.; Douglas, P.; Lillo, C. (1995). **Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves.** *Plant Physiol.*, **107**, 451-457.
- Makino, A. y Osmond, B. (1991). **Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplast and mitochondria in pea and wheat.** *Plant Physiol.*, **96**, 355-362.
- Maldonado, J.M. y Aparicio, P.J. (1987). **Photoregulation of nitrate assimilation in eukariotic organisms.** En *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ullrich, Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 77-83.
- Márquez, A.J. (1985). **Biosíntesis de glutamato en *Chlamydomonas reinhardtii*. Purificación y propiedades de las enzimas con actividad glutamato sintasa.** Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Márquez, A.J.; Avila, C.; Forde, B.G.; Wallsgrove, M. (1988). **Ferredoxin-glutamate synthase from barley leaves: Rapid purification and partial characterization.** *Plant Physiol. Biochem.*, **26**, 645-651.
- Márquez, A.J.; de la Rosa, M.A.; Vega, J.M. (1982). **Studies by affinity chromatography on the NAD(P)H and FAD sites of nitrate reductase from *Ankistrodesmus braunii*.** *J. Chromatography*, **235**, 435-443.
- Márquez, A.J.; Gotor, C.; Romero, L.C.; Galván, F.; Vega, J.M. (1986). **Ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Studies of the glutamate synthase activities.** *Int.J. Biochem.*, **18**, 531-535.
- Martin, M.; Urteaga, B.; Sabater, B. (1986). **Chloroplast protein synthesis during barley leaf growth and senescence: effect of leaf excision.** *J. Exp. Bot.*, **37**, 230-237.
- Matile, P. (1992). **Chloroplast senescence.** En *Crop Photosynthesis: spatial and temporal determinants*. (N. Baker y H. Thomas, Eds.) Amsterdam: Elsevier, pp. 413-440.
- Matoh, T. y Takahashi, E. (1981). **Glutamate synthase in greening pea shoots.** *Plant Cell Physiol.*, **22**, 727-731.
- Matoh, T. y Takahashi, E. (1982). **Changes in the activities of ferredoxin- and NADH-glutamate synthase during seedling development of peas.** *Planta*, **154**, 289-294.
- Matoh, T.; Ida, S.; Takahashi, E. (1980). **A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase.** *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, **43**, 1-6.
- Mattana, M.; Coraggio, I.; Brambilla, I.; Bertani, A.; Reggiani, R. (1996). **Nitrate assimilation during the anaerobic germination of rice: expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase.** *Planta*, **199**, 74-78.
- Mauriño, S.G.; Ehevarría, C.; Mejías, J.A.; Vargas, M.A.; Maldonado, J.M. (1986). **Properties of the *in vivo* nitrate reductase assay in maize, soybean, and spinach leaves.** *J. Plant Physiol.*, **124**, 123-130.

- Mayer, A.M. y E. Harel. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.*, **18**, 193-215.
- McGrath, R.B. y Coruzzi, G.M. (1991). A gene network controlling glutamine and asparagine biosynthesis in plants. *Plant J.*, **1**, 275-280.
- McNally, A.F. y Hirel, B. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiologie Vegetale*, **21**, 761-774.
- McNally, A.F.; Hirel, B.; Gadal, P.; Mann, A.F.; Stewart, G.R. (1983). Glutamine synthetase in higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.*, **72**, 22-25.
- Merlo, L.; Ferretti, M.; Passera, C.; Ghisi, R. (1995). Light-modulation of nitrate reductase activity in leaf and roots of maize. *Physiol. Plant.*, **94**, 305-311.
- Migge, A. y Becker, T.W. (1996). In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 665-671.
- Migge, A.; Carrayol, E.; Kunz, C.; Hirel, B.; Fock, H.; Becker, T. (1997). The expression of tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. *J. Exp. Bot.*, **48** (311), 1175-1184.
- Moorhead, G.; Douglas, P.; Morrice, N.; Scarabel, M.; Aitken, A.; Mackintosh, C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicosin. *Curr. Biol.*, **6**, 1104-1113.
- Morigasaki, S.; Takata, K.; Sanada, Y.; Wada, K.; Yee, B.C.; Shin, S.; Buchanan, B.B. (1990). Novel forms of ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase from spinach roots. *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 75-80.
- Nalbantoglu, B.; Hirasawa, H.; Moomaw, C.; Nguyen, H.; Knaff, D.B.; Allen, R. (1994). Cloning and sequencing of the gene encoding spinach ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 557-561.
- Navarro, F. (1996). Estudio de las glutamato sintasas de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Navarro, F.; Chávez, S.; Candau, P., Florencio, F.J. (1995). Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 753-767.
- Nelson, R.S.; Ryan, S.A.; Harper, J.G. (1983). Soybean mutants lacking constitutive nitrate reductase activity: selection and initial plant characterization. *J. Plant Physiol.*, **72**, 503-509.

- Nussaume, L.; Vincentz, M.; Meyer, C.; Boutin, J.P.; Caboche, M. (1995). **Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by a N-terminal deletion.** *Plant Cell.*, **7**, 611-621.
- Oaks, A. (1992). **A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots.** *Bioscience*, **42**, 103-111.
- Oaks, A.; Hirel, B. (1985). **Nitrogen Metabolism in roots.** *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **36**, 345-365.
- Oji, Y.; Watanabe, M.; Wakiuchi, N.; Okamoto, S. (1985). **Nitrite reduction in barley-root plastids: dependence on NADPH coupled with glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase.** *Planta*, **165**, 85-90.
- Oliveira, I.C.; Lam, H.M.; Coschigano, K.; Melo-Oliveira, R.; Coruzzi, G.M. (1997). **Molecular-genetics dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Physiol. Biochem.*, **35** (3), 185-198.
- Ouhmidou, B.; Cauderon, Y.; Cherel, I.; Champigny, M.L. (1990). **Nitrate reductases in hexaploid and tetraploid wheats and *Aegilops*.** *Theor. Appl. Genet.*, **79**, 8-12.
- Ozawa, T.; Lilley, T.H.; Haslam, E. (1987). **Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruits.** *Phytochem.*, **26** (11), 2937-2942.
- Pajuelo, E. (1993). **Aproximación inmunológica y molecular a la estructura cuaternaria y regulación en cultivos sincrónicos de la ferredoxina-nitrito reductasa de *Chlamydomonas reinhardtii*.** Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Pelsy, F. y Gonneau, M. (1991). **Genetic and biochemical analysis of intragenic complementation events among the nitrate reductase apoenzyme-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*.** *Genetics*, **127**, 199-204.
- Pereira, S.; Carvalho, H.; Sunkel, C.; Salema, R. (1992). **Inmunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L.** *Protoplasma*, **167**, 66-73.
- Pérez-Rodríguez, J. y Valpuesta, V. (1996). **Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves.** *Physiol. Plant.*, **97**, 576-582.
- Peterman, T.K. y Goodman, H.M. (1991). **The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds.** *Mol. Gen. Genet.*, **230**, 145-154.
- Pistorius, E.K.; Gewtz, H.S.; Voss, H.; Vennesland, B. (1976). **Reversible inactivation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris* in vivo.** *Planta*, **128**, 73-80.
- Quesada, A.; Krapp, A.; Trueman, L.J.; Daniel-Vedele, F.; Fernández, E.; Forde, B.G.; Caboche, M. (1997). **PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA**

homologous to the high-affinity nitrate transporters of *crnA* family. *Plant Mol. Biol.*, **34**, 265-274.

Redinbaugh, M.G. y Campbell, W.H. (1993). Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.*, **101**, 1249-1255.

Rideal, E.K. y Roberts, R. (1951). The photochemistry of native proteins. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A.*, **205**, 391-408.

Sakakibara, H.; Kawabata, S.; Hase, T.; Sugiyama, T. (1992b). Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetases and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1193-1198.

Sakakibara, H.; Watanabe, M.; Hase, T.; Sugiyama, T. (1991). Molecular cloning of complementary DNA encoding for ferredoxin dependent glutamate synthase in maize leaf. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2028-2035.

Sakakibara, H.J.; Kawabata, S.; Takahashi, H.; Hase, T.; Sugiyama, T. (1992a). Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 49-58.

Sakamoto, A.; Ogawa, M.; Masumura, T.; Shibata, D.; Takeba, G. (1989). Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oriza sativa* L. *Plant Mol. Biol.*, **13**, 611-614.

Sambrook, J.; Frisch, E.F.; Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sánchez, J. y Harwood, J.L. (1992). Fatty acid synthesis in soluble fractions from olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Plant Physiol.*, **140**, 402-408.

Sechley, K.A.; Yamaya, T.; Oaks, A. (1992). Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cytology*, **134**, 85-163.

Seith, B.; Schuster, C.; Mohr, H. (1991). Coaction of light, nitrate and a plastidic factor in controlling nitrite-reductase gene expression in spinach. *Planta*, **184**, 74-80.

Sherrard, J.H.; Kennedy, J.A.; Dalling, M.J. (1979). *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves III, Isolation and partial characterization of a nitrate reductase-inactivating factor. *Plant Physiol.*, **64**, 640-645.

Schuster, C. Y Mohr, H. (1990). Appearance of nitrite reductase mRNA in mustard seedlings cotyledons is regulated by phytochrome. *Planta*, **181**, 327-334.

Simpson, R.J. y Dalling, M.J. (1981). Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). III. Enzymology and transport of amino acids from senescing flag leaves. *Planta*, **151**, 447-456.

- Sivak, M.N.; Lea, P.J.; Blackwell, R.D.; Murray, A.J.S.; Hall, N.P.; Kendall, A.C.; Turner, J.C.; Wallsgrove, R.M. (1988). **Some effects of oxygen on photosynthesis by photorespiratory mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.).** *J. Exp. Bot.*, **39** (203), 655-666.
- Small, I.S. y Gray, K.C. (1984). **Synthesis of wheat leaf nitrite reductase *de novo* following induction with nitrate and light.** *Eur. J. Biochem.*, **145**, 291-297.
- Smart, C. (1994). **Gene expression during leaf senescence.** *New Phytol.*, **126**, 419-448.
- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949). **Colorimetric method of analysis.** Vol 2, Van Nostrand, New York, pp. 804.
- Solomonson, L.P. (1974). **Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide.** *Biochem. Biophys. Acta*, **334**, 297-308.
- Solomonson, L.P. y Vennesland, B. (1972). **Properties of nitrate reductase of *Chlorella*.** *Biochem. Biophys. Acta*, **75**, 276-278.
- Solomonson, L.P.; Barber, M.J. (1990). **Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation.** *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, **41**, 225-253.
- Solomonson, L.P.; Howard, W.D.; Yamaya, T.; Oaks, A. (1984). **Mode of action of natural inactivator proteins from corn and rice on a purified assimilatory nitrate reductase.** *Arch. Biochim. Biophys.*, **233**, 469-474.
- Somerville, C.R. y Ogren, W. L. (1979). **A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*.** *Nature*, **280**, 833-836.
- Somerville, C.R.; Ogren, W.L. (1980). **The inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking glutamate synthase activity.** *Nature*, **286**, 257-259.
- Srivastava, H.S.; Oaks, A.; Bakytá, I.L. (1976). **The effect of nitrate on early seedling growth in *Zea mays*.** *Can. J. Bot.*, **54**, 923-929.
- Stewart, G.R.; Mann, A.F.; Fentem, P.A. (1980). **Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, glutamate synthase.** En *The biochemistry of Plants: Amino Acids and Derivatives*, Vol. 5, (B.J. Miflin, Ed.) New York Academic, pp 271-327.
- Streit, L. y Feller, U. (1982). **Changing activities of nitrogen-assimilating enzymes during growth and senescence of dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**, 273-281.
- Stulen, I.; Koch-Bosma, T.; Koster, A. (1971). **An endogenous inhibitor of nitrate reductase in radish cotyledons.** *Acta Bot. Neerl.*, **20**, 389-396.
- Sueoka, N.; Chiang, K.S.; Kates, J.R. (1967). **Deoxyribonucleic acid and replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores.** *J. Mol. Biol.*, **25**, 47-66.

- Suzuki, A. y Rothstein, S. (1997). **Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Cloning of cDNA, expression in different tissues of wild-type and *gltS* mutant strains, and light induction.** *Eur. J. Biochem.*, **234**, 708-718.
- Suzuki, A.; Audet, C.; Oaks, A. (1987). **Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves.** *Plant Physiol.*, **84**, 578-581.
- Suzuki, A.; Burkhart, W.; Rothstein, S. (1996). **Nitrogen effects on the induction of ferredoxin-dependent glutamate synthase and its mRNA in maize leaves under the light.** *Plant Sci.*, **114**, 83-91.
- Suzuki, A.; Oaks, A.; Jacquot, J.P.; Vidal, J.; Gadal, P. (1985). **An electron transport system in maize roots for the reactions of glutamate synthase and nitrite reductase.** *Plant Physiol.*, **78**, 374-378.
- Suzuki, A.; Vergnet, C.; Morot-Gaudry, J.F.; Zehnacker, C.; Grosclaude, J. (1994). **Immunological characterization of ferredoxin and methyl viologen interacting domains of glutamate synthase using monoclonal antibodies.** *Plant Physiol. Biochem.*, **32** (5), 619-626.
- Suzuki, A.; Vidal, J.; Gadal, P. (1982). **Glutamate synthase isoforms in rice: immunological studies of enzymes in green leaves, etiolated leaves, and root tissues.** *Plant Physiol.*, **70**, 827-832.
- Suzuki, A. y Gadal, P. (1984). **Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms.** *Physiol. Veg.*, **22**, 471-486.
- Tobin, A.K.; Ridley, S.M.; Stewart, G.R. (1985). **Changes in the activities of chloroplast and cytosolic iso-enzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat.** *Planta*, **163**, 544-548.
- Trotta, P.P.; Platzer, K.E.B.; Haschmeyer, R.H.; Meister, A. (1974). **Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4607-4611.
- Trueman, L. J.; Onyecho, I.; Forde, B.G. (1996). **Recent advances in the molecular biology of a family of eukaryotic high affinity nitrate transporters.** *Plant Physiol. Biochem.*, **34** (5), 621-627.
- Vaughn, K.C.; Campbell, W.H. (1988). **Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves.** *Plant Physiol.*, **88**, 1354-1357.
- Vesey, J.K. y Waterer, J. (1992). **In Search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: Recent developments.** *Physiol. Plant.*, **84**, 171-176.

- Vincent, M. Y Caboche, M. (1991). **Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana glauca* plants.** *EMBO J.*, **10**, 1027-1035.
- Walker, D.A.; Cerovic, Z.G.; Robinson, S.P. (1987). **Isolation of intact chloroplasts: general principles and criteria of integrity.** *Methods Enzymol.*, **148** (15), 145-157.
- Wallace, W. (1974). **Purification and properties of nitrate reductase inactivating enzyme.** *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 265-276.
- Wallace, W. y Oaks, A. (1986). **Role of proteinases in the regulation of nitrate reductase.** En *Plant Proteolytic Enzymes*, (M.J. Dalling, Ed.) CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, Vol. 2, pp. 81-89.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J.; Mifflin, B.J. (1982). **The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves.** *Planta*, **154**, 473-476.
- Wallsgrave, R.M.; Turner, J.C.; Hall, N.P.; Kendall, A.C.; Bright, S.W.J. (1987). **Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase: biochemical and genetics analysis.** *Plant Physiol.*, **83**, 155-158.
- Watanabe, S.; Sakai, T.; Goto, S.; Yaginuma, T.; Hayakawa, T.; Yamaya, T. (1996). **Expression of NADH-dependent glutamate synthase in response to the supply of nitrogen in rice cells in suspension culture.** *Plant Cell Physiol.*, **37**, 1034-1037.
- Wilkinson, J.Q. y Crawford, N.M. (1991). **Identification of the *Arabidopsis thaliana* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2.** *Plant Cell*, **3**, 461-471.
- Woodall, J. (1994). **Studies of glutamine synthetase in *Lotus* species and the occurrence of root GS2 in other legumes.** Tesis Doctoral. University College, London.
- Yamagishi, K.; Sato, T.; Ogura, N.; Nakagawa, H. (1988). **Isolation and some properties of a 115-kilodalton nitrate reductase-inactivator protein from *Spinacia oleracea*.** *Plant Cell Physiol.*, **29**, 371-376.
- Yamaya, T.; Hayakawa, T.; Tanasawa, K.; Kamachi, K.; Mae, T.; Ojima, K. (1992). **Tissue distribution of glutamine synthetase and glutamate synthase in rice leaves.** *Plant Physiol.*, **100**, 1427-1432.
- Yamaya, T.; Oaks, A.; Boesel, L. (1980a). **Characteristics of nitrate reductase inactivating proteins obtained from corn roots and rice cell cultures.** *Plant Physiol.*, **65**, 141-145.
- Yamaya, T.; Solomonson, L.P.; Oaks, A. (1980b). **Action of corn and rice inactivating proteins on purified nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*.** *Plant Physiol.*, **65**, 146-150.

Yoshimura, T.; Sekino, N.; Okuo, K. (1992). A nitrate reductase inactivator protein from spinach. Purification, molecular weight and subunit composition. *Plant Cell Physiol.*, **33** (4), 363-369.

Yu, J. y Woo, K.C. (1991). Correlation between the development of photorespiration and the change in activities of  $\text{NH}_3$  assimilation enzymes in greening oat leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, **18**, 583-588.

Zehnacker, C.; Becker, T.W.; Suzuki, A.; Carrayol, E.; Caboche, M.; Hirel, B. (1992). Purification and properties of tobacco ferredoxin-dependent glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones. *Planta*, **187**, 266-274.

antes  
del de

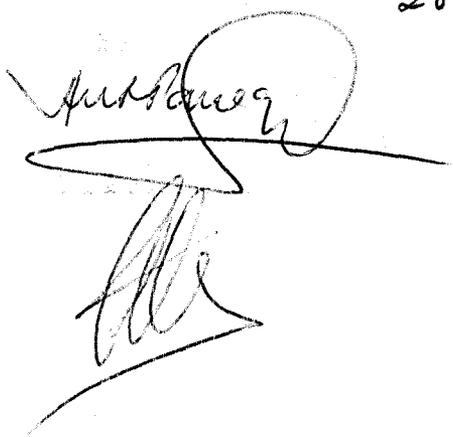
na Purificación Pajuelo Domínguez  
Regulación de la exención de eutimas de  
la acumulación de nitrógeno en plantas superiores

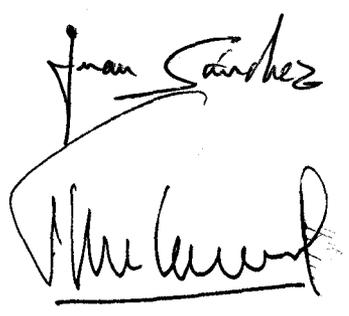
APTO CUM LAUDE

28

Noviembre

97



Juan Sánchez  


  
Vocal,  
El Doctorado  




501038447

FBI E TD / 387

1038447