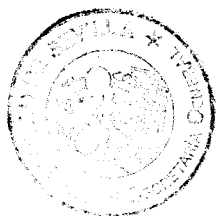


TA
588



Credencial registrada en el Título Doctor
el día 143 de mayo de 138 del 11
correspondiente a la fecha 1 OCT. 1990
Sevilla,



Alvaro de la Hita

R. 9396

GLUTAMINA SINTETASA DE LA CIANOBACTERIA UNICELULAR

***Synechocystis* sp. PCC 6803:**

Purificación, estudios de su regulación por la fuente de nitrógeno y
clonación del gen *glnA*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Biología por el Licenciado Angel Mérida Berlanga

Sevilla, Noviembre de 1990

Director:

Dr. Francisco Javier
Florencio Bellido

Director:

Pedro Candau Chacón

Dr. Pedro Candau Chacón

A mis padres

A Belén

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla. Agradezco al Profesor Miguel García Guerrero, Director del Departamento, el haberme acogido en su equipo de investigación.

Al Dr. F. Javier Florencio, Director de esta tesis, deseo agradecerle su apoyo a lo largo de estos años, así como su valiosa aportación de ideas y ayuda, fundamentales para la realización de este trabajo. Al Dr. Pedro Candau, Director de esta tesis, le agradezco su interés y aportación en el desarrollo de este trabajo.

A Belén, mi mujer, le agradezco su constante apoyo y la ayuda en la obtención de algunos de los resultados que se presentan en esta tesis. Su presencia y ánimo me han permitido llevar adelante este trabajo.

A Enrique Flores y Antonia Herrero les agradezco en primer lugar la inestimable ayuda, tanto en aportación de ideas como de materiales, en la obtención de los resultados de biología molecular que se presentan en esta tesis. Por otro lado les agradezco profundamente su ayuda y amistad a lo largo de estos años, sus aportaciones han sido fundamentales para mi formación científica.

A Silvia Marqués le agradezco profundamente la ayuda prestada en los primeros años de la realización de este trabajo así como la amistad y apoyo mostrados durante todo este tiempo

A Jesús Díez Dapena y a Antonio López Ruíz, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Córdoba, les agradezco la obtención de los antisueros empleados en este trabajo. Al profesor Jack Preiss, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Michigan, le agradezco el haberme proporcionado la genoteca de *Synechocystis*. A Paco Madueño, por su ayuda en el aprendizaje de las técnicas de biología molecular.

A Pepe Nieto, Rocio Rodríguez, Alicia Muro, Miguel Vega y Tere Ruíz, por su amistad durante estos años.

Finalmente, quiero agradecer a la Junta de Andalucía la concesión de una beca que me ha permitido desarrollar este trabajo de investigación.

INDICE

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCION.....	3
II. MATERIALES Y METODOS.....	14
II. A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	15
II. A. 1. ORGANISMOS EMPLEADOS.....	15
II. A. 1. 1. Cianobacterias.....	15
II. A. 1. 2. Estirpes de Escherichia coli.....	15
II. A. 2. CONDICIONES ESTANDAR DE CULTIVO.....	16
II. A. 2. 1. Condiciones de cultivo en medio líquido.....	16
II. A. 2. 2. Condiciones de cultivo en medio sólido.....	19
II. A. 3. RECOGIDA DE CELULAS.....	20
II. B. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES.....	20
II. B. 1. ROTURA POR TRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS.....	20
II. B. 2. ROTURA POR TRITURACION DE CELULAS CONGELADAS CON AIRE LIQUIDO.....	21
II. C. ENSAYOS ENZIMATICOS.....	22
II. C. 1. ENSAYOS <i>IN SITU</i> DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA....	22
II. C. 1. 1. Determinación de la actividad transferasa.....	22
II. C. 1. 2. Determinación de la actividad biosintética.....	23
II. C. 2. ENSAYOS <i>INVITRO</i> DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA...	24
II. C. 2. 1. Determinación de la actividad transferasa.....	24
II. C. 2. 2. Determinación de la actividad biosintética.....	24
II. C. 3. ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA.....	25

II. D.	TECNICAS EXPERIMENTALES.....	25
II. D. 1.	TECNICAS EXPERIMENTALES BIOQUIMICAS.....	25
II. D. 1. 1.	CROMATOGRAFIAS EN COLUMNA.....	25
II. D. 1. 1. 1.	Cromatografía de intercambio iónico.....	25
II. D. 1. 1. 2.	Cromatografía de afinidad en gel de 2',5'-ADP-Sefarosa.....	26
II. D. 1. 2.	ELECTROFORESIS.....	26
II. D. 1. 2. 1.	Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico.....	26
II. D. 1. 2. 2.	Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	28
II. D. 1. 2. 3.	Immunolectroforesis en presencia de Triton X-100.....	28
II. D. 1. 2. 4.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa...	29
II. D. 1. 3.	IMMUNOPRECIPITACION.....	30
II. D. 1. 4.	DOBLE DIFUSION EN GEL.....	30
II. D. 1. 5.	CAMBIO DE TAMPON DE LAS MUESTRAS.....	31
II. D. 2.	TECNICAS EXPERIMENTALES DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	31
II. D. 2. 1.	AISLAMIENTO DE ADN DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	31
II. D. 2. 2.	AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO DE <i>Escherichia coli</i>	32
II. D. 2. 3.	TRANSFORMACION DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	33
II. D. 2. 4.	OBTENCION DE CELULAS TRANSFORMABLES DE <i>Escherichia coli</i>	34
II. D. 2. 5.	TRANSFORMACION DE <i>Escherichia coli</i>	34

II. D. 2. 6.	INFECCION DE <i>Escherichia coli</i> CON λ -ZAP II	35
II. D. 2. 7.	TRANSFERENCIA DE ADN DE FAGOS A FILTROS DE NITROCELULOSA.....	36
II. D. 2. 8.	HIBRIDACION DE FILTROS DE NITROCELULOSA CON SONDA DE ADN MARCADA CON ^{32}P	36
II. D. 2. 9.	TRANSFERENCIA DE ADN A FILTRO DE NYLON.....	37
II. D. 2. 10.	HIBRIDACION DE FILTROS DE NYLON CON SONDA DE ADN MARCADA CON ^{32}P	38
II. D. 2. 11.	MARCAJE DE LA SONDA DE ADN CON ^{32}P	39
II. D. 2. 12.	DETECCION MEDIANTE AUTORADIOGRAFIA DE ADN MARCADO CON ^{32}P	40
II. D. 2. 13.	HIBRIDACION CON SONDA DE ADN MARCADO CON DIGOXIGENINA.....	40
II. D. 2. 14.	MARCAJE DE LA SONDA DE ADN CON DIGOXIGENINA.....	41
II. D. 2. 15.	DETECCION INMUNOLOGICA DE ADN MARCADO CON DIGOXIGENINA.....	42
II. D. 2. 16.	EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA.....	43
II. D. 2. 17.	LIGACION DE FRAGMENTOS DE ADN.....	43
II. D. 2. 18.	RESTRICCION DE ADN.....	44
II. E.	METODOS ANALITICOS.....	44
II. E. 1.	SEPARACION Y DETERMINACION DE GLUTAMATO Y GLUTAMINA MEDIANTE HPLC.....	44
II. E. 2.	ANALISIS DE NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS..	46
II. E. 3.	DETERMINACION DE LOS NIVELES DE α -CETOGLUTARATO EN <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	48
II. E. 4.	DETERMINACION DE CLOROFILA.....	49

II. E. 5. DETERMINACION DE PROTEINA.....	49
II. E. 6. DETERMINACION DE γ -GLUTAMIL HIDROXAMATO.....	50
II. E. 7. DETERMINACION DE AMONIO.....	50
II. E. 8. DETERMINACION DE ADN.....	51
II. E. 9. DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD DE ^{32}P	51
II. E. 10. CENTRIFUGACIONES.....	51
II. E. 11. MEDIDAS DE pH.....	52
II. F. REACTIVOS.....	52
II. F. 1. PROCEDENCIA DE COMPUESTOS QUIMICOS Y BIOQUIMICOS.....	52
III. RESULTADOS.....	54
III. A. PURIFICACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE	
<i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	55
III. A. 1. METODO DE PURIFICACION.....	55
III. A. 1. 1. Cromatografía de intercambio iónico en	
DEAE-celulosa.....	55
III. A. 1. 2. Cromatografía de afinidad en gel de	
2', 5'-ADP-Sefarosa.....	57
III. A. 2. CRITERIOS DE HOMOGENEIDAD.....	61
III. A. 2. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	61
III. A. 2. 1. 1. Electroforesis en condiciones no	
desnaturalizantes.....	61
III. A. 2. 1. 2. Electroforesis en condiciones	
desnaturalizantes.....	61
III. B. PROPIEDADES DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE	
<i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	63
III. B. 1. PESO MOLECULAR DETERMINADO POR ELECTROFORESIS	

EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.....	63
III. B. 2. VALORES DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS (Km) PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA ACTIVIDAD TRANSFERASA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	65
III. B. 3. VALORES DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS (Km) PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA ACTIVIDAD BIOSINTETICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	65
III. B. 4 EFECTO DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD BIOSINTETICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	73
III. B. 5. EFECTOS DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES TRANSFERASAS Y BIOSINTETICAS DE LA GLUTAMINA SINTETASA	73
III. B. 6. INHIBICION POR ADP DE LA ACTIVIDAD BIOSINTETICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	75
III. B. 7. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	79
III. C. REGULACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA: EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO.....	85
III. C. 1. NIVELES DE ACTIVIDAD Y PROTEINA GLUTAMINA SINTETASA EN CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO O AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO.....	85
III. C. 2. EFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO.....	86
III. C. 3. EFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LOS NIVELES DE PROTEINA GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO.....	89

III. C. 4.	EFFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO.....	89
III. C. 5.	EFFECTO DE LA AZASERINA SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	94
III. C. 6.	EFFECTO DE LA 6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINA SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	95
III. C. 8.	EFFECTO DE LA AZASERINA SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO Y TRATADAS CON AMONIO.....	95
III. C. 9.	EFFECTO DE LA CARENCIA DE NITROGENO SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	99
III. C. 10.	VARIACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS TRAS LA ADICION DE AMONIO A CELULAS SOMETIDAS A CARENCIA DE NITROGENO.....	100
III. C. 11.	NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS EN DISTINTAS CONDICIONES METABOLICAS.....	103
III. C. 12.	NIVELES INTRACELULARES DE α -CETOGLUTARATO EN DISTINTAS CONDICIONES METABOLICAS.....	105
III. D.	ESTUDIOS IN VITRO DE LA FORMA INACTIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	108
III. D. 1.	ACTIVIDADES <i>IN VITRO</i> E <i>IN SITU</i> DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO TRATADAS Y SIN TRATAR CON AMONIO.....	108
III. D. 2.	REACTIVACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA	

INACTIVADA POR AMONIO MEDIANTE TRATAMIENTO CON FOSFATASA ALCALINA.....	108
III. D. 3. INHIBICION POR FOSFATO DE LA REACTIVACION POR FOSFATASA ALCALINA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	112
III. D. 4. MARCAJE <i>IN VIVO</i> CON ³² P DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE EL PROCESO DE INACTIVACION POR AMONIO.....	112
III. D. 5. REACTIVACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA TRAS SU ELUCION DE UNA MATRIZ DE DEAE-CELULOSA MEDIANTE UN GRADIENTE DE KCl.....	114
III. D. 6. REACTIVACION POR pH ALCALINO DE LA GLUTAMINA SINTETASA INACTIVADA POR AMONIO.....	117
III. D. 8. COMPARACION DE PARAMETROS CINETICOS DE LAS FORMAS ACTIVA E INACTIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA	117
III. D. 9. DEPENDENCIA DE CATIONES DIVALENTES DE LA ACTIVIDAD TRANSFERASA DE LA GLUTAMINA SINTETASA EN FORMA ACTIVA E INACTIVA	119
III. D. 10. INACTIVACION <i>IN VITRO</i> DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	122
III. E. CLONACION DEL GEN <i>glnA</i> DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803...	124
III. E. 1. OBTENCION DE LA SONDA DE ADN	124
III. E. 2. AISLAMIENTO DE LOS FAGOS QUE CONTIENEN EL GEN <i>glnA</i> DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	124
III. E. 3. EXTRACCION DEL FRAGMENTO DE ADN DE <i>Synechocystis</i> DEL FAGO λ-ZAP II.....	125
III. E. 4. COMPROBACION DE LA PRESENCIA DEL GEN <i>glnA</i> DE <i>Synechocystis</i> EN LOS PLASMIDOS OBTENIDOS.....	128
III. E. 5. LOCALIZACION DE DIANAS DE RESTRICCION EN	

ELFRAGMENTO DE ADN DE <i>Synechocystis</i> QUE CONTIENE EL GEN <i>glnA</i>	128
III. F. TRANSFORMACION DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803 CON EL GEN <i>glnA</i> DE <i>Anabaena</i> PCC 7120.....	130
III. F. 1. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pCSA6.....	130
III. F. 2. TRANSFORMACION DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803 CON pCSA6.	133
III. F 3. ESTUDIO GENOTIPICO DE LAS ESTIRPES AM 4, AM 5 Y AM 6...	133
III. F. 4. ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE LA ESTIRPE AM 6 DURANTE LAS DISTINTAS FASES DE CRECIMIENTO.....	139
IV. DISCUSION	142
IV.A. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	143
IV. B. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803 : EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO.....	153
IV. C. CARACTERIZACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA INACTIVA.....	168
IV. D. CLONACION DEL GEN <i>glnA</i> DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803....	173
IV. E. OBTENCION DE TRANSFORMANTES DE <i>Synechocystis</i> PCC 6803 CONTENIENDO EL GEN <i>glnA</i> DE <i>Anabaena</i> PCC 7120.....	175
V. CONCLUSIONES	180
VI. BIBLIOGRAFIA	183

ABREVIATURAS

α KG	α -cetoglutarato
ASP	Aspartato
BSA	Seroalbúmina bovina
DEAE	Dietilaminoetil
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucina
EDTA	Etilendiaminotetraacético
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfonato
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
LB	Medio de cultivo Luria-Bertoni
min	Minuto
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
OPA	o-ftaldialdehido
PIPES	Piperacina-N,N'-bis(2 etanosulfonato)
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SER	Serina
SDS	Dodecilsulfato sódico

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

I. INTRODUCCION

LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo amplio y bien definido de procariotas fotoautótrofos cuya principal característica es la de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la de algas verdes y plantas superiores (Wolk, 1973; Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos tipos fundamentales de cianobacterias : unicelulares, englobadas en las Secciones I y II de la clasificación propuesta por Rippka et al. (1979), según tengan o no la capacidad de formar endosporas, y filamentosas, clasificadas en las Secciones III, IV y V. En estas últimas, las células se presentan agrupadas formando tricomas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). A partir de los tricomas de los dos últimos grupos se pueden diferenciar, creciendo en dinitrógeno, unas células especializadas en la fijación de nitrógeno: los heterocistos, que proporcionan un ambiente sin oxígeno, necesario para que sea estable la nitrogenasa, enzima que cataliza la reducción de dinitrógeno a amonio.

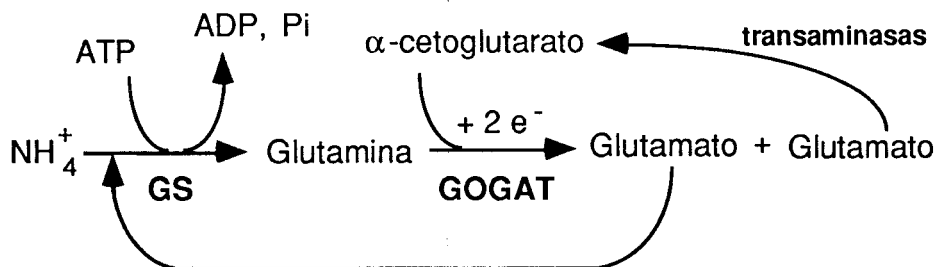
La principal vía de asimilación de carbono en estos organismos la constituye la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, aunque hay evidencias de que la asimilación de $^{14}\text{CO}_2$ en el ácido 3-fosfoglicérico no es la única vía de incorporación de carbono en cianobacterias. Así, Richter (1961) en *Synechococcus* PCC 6301 y Weathers y Allen (1978) en *Synechocystis* PCC 6308, han demostrado el marcaje de glutamato, aspartato, alanina y fosfoenolpiruvato a partir de $^{14}\text{CO}_2$, indicando que la incorporación de CO_2 a través de las enzimas

fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato carboxilasa puede ser importante en estos organismos.

Sólo una minoría de las especies de cianobacterias estudiadas hasta el momento son capaces de crecer en condiciones aeróbicas en oscuridad empleando un sustrato orgánico (Rippka, 1972; Stanier, 1973), presentando algunas, entre ellas *Synechocystis* PCC 6803, la capacidad potencial de crecer fotoheterotróficamente (Rippka et al., 1979). Si bien las cianobacterias poseen las enzimas glucolíticas y la mayoría de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, estas rutas no operan con un carácter catabólico, sino que desempeñan funciones biosintéticas. Esto es debido a que estos organismos carecen del complejo enzimático de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y de succinil-CoA sintasa, por lo que el ciclo de los ácidos tricarbónicos queda incompleto tras la síntesis de α -cetoglutarato (Smith et al., 1967).

Las cianobacterias pueden usar el nitrato o el amonio como únicas fuentes de nitrógeno para su crecimiento y algunas de ellas presentan la capacidad adicional de fijar nitrógeno atmosférico. Cuando está presente más de un tipo de fuente nitrógenada, se observa una preferencia en su utilización (amonio antes que nitrato y éste a su vez antes que dinitrógeno), lo cual es un reflejo del control al que está sujeto el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias. Las estirpes utilizadas en este trabajo, *Synechocystis* PCC 6803 y *Synechococcus* PCC 6301, son cianobacterias unicelulares pertenecientes a la Sección I, capaces de utilizar para su crecimiento tanto nitrato como amonio, pero no nitrógeno atmosférico (Rippka et al., 1979).

La asimilación de amonio, incorporado directamente del medio o bien producido por la reducción del nitrato o del dinitrógeno atmosférico, tiene lugar en cianobacterias a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) (L-glutamato:amonio ligasa [ADP sintetasa], EC 6. 3. 1. 2) y glutamato sintasa (GOGAT) (L-glutamato:ferredoxina oxidoreductasa [transaminante] EC 1. 4. 7. 11), las cuales forman la denominada ruta GS-GOGAT. Son múltiples las evidencias existentes en cianobacterias acerca del papel preponderante de esta ruta en la asimilación de amonio (Stewart et al., 1975; Meeks et al., 1977; Meeks et al., 1978). En ella, la formación neta de una molécula de glutamato a partir de una de amonio y otra de α -cetoglutarato requiere una molécula de ATP y dos equivalentes de poder reductor. Un resumen del proceso se recoge en el esquema siguiente :



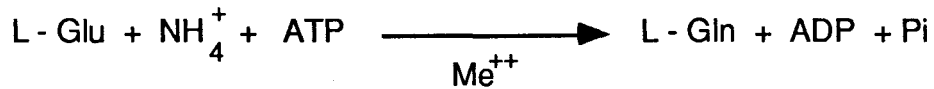
La mencionada ruta GS-GOGAT junto con la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), constituyen las principales vías de asimilación de amonio en microorganismos. En cianobacterias se ha detectado actividad GDH en algunas especies, aunque en la mayoría de ellas estos niveles son extremadamente bajos (Stewart, 1980). En *Synechocystis* PCC 6803 se detectan niveles considerables de esta actividad enzimática, siendo la primera cianobacteria donde se ha purificado hasta homogeneidad una glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH

(Florencio et al., 1987). Sin embargo, el posible papel de esta enzima en la asimilación de amonio en *Synechocystis* PCC 6803 permanece aún sin esclarecer.

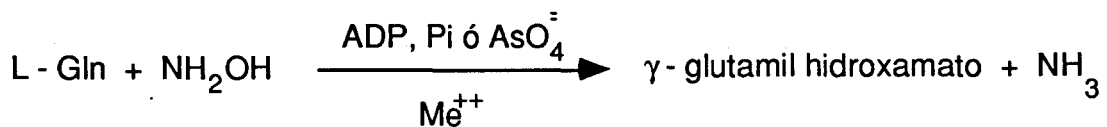
Si bien son conocidos numerosos aspectos del metabolismo de las cianobacterias, la genética de estos organismos no ha sido desarrollada hasta hace pocos años, debido fundamentalmente a la incapacidad de introducir material genético en la mayoría de las especies estudiadas. Así, de cerca de 300 estirpes de cianobacterias disponibles como cultivos axénicos, sólo 10, todas ellas unicelulares, son transformables por ADN (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987). En las cianobacterias capaces de ser transformadas con ADN, entre ellas *Synechocystis* PCC 6803 (Grigorieva y Shestakov, 1982), este proceso parece ser natural, no requiriéndose ningún tratamiento químico concreto. Más recientemente, Wolk et al. (1984) han desarrollado un sistema de transferencia genética mediante conjugación desde *Escherichia coli* hasta la cianobacteria. Este sistema ha sido empleado con éxito en las estirpes del género *Anabaena*, permitiendo el desarrollo del estudio de la biología molecular de la fijación de nitrógeno en los heterocistos, así como del proceso de diferenciación de este tipo particular de células.

LA GLUTAMINA SINTETASA

El importante papel que desempeña la glutamina sintetasa en la asimilación de amonio ha determinado que sean numerosos los estudios realizados sobre ella, pudiéndose afirmar que es en la actualidad una de las enzimas mejor conocidas. La glutamina sintetasa cataliza la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato, según la siguiente reacción, denominada reeacción biosintética :



Igualmente puede catalizar la reacción no fisiológica γ - glutamil transferasa, según la ecuación :



La actividad transferasa suele ser varias veces superior a la biosintética, lo cual, junto con el hecho de que el ensayo transferasa es cuantificable espectrofotométricamente, determina su uso en las determinaciones rutinarias de actividad. No obstante, la actividad transferasa no siempre es un fiel indicador de la actividad biosintética, fisiológica, de una preparación enzimática, habiéndose obtenido mutantes de la cianobacteria *Anabaena variabilis* que presentan una glutamina sintetasa afectada en su actividad biosintética pero no en la actividad transferasa (Kerby et al., 1986). Esta diferencia entre las dos actividades es patente además en sus respuestas a diversos efectores alostéricos (Mérida et al., 1990).

Las glutamina sintetasa de procariontes presentan una serie de características estructurales comunes, como son el constar de doce subunidades idénticas, de un peso molecular cercano a los 50 kDa, formando dos anillos superpuestos, compuestos cada uno de ellos por seis subunidades. Las subunidades de un anillo conforman una estructura hexagonal alrededor de un hueco central. Esta estructura ha sido objeto recientemente de un exhaustivo

estudio por parte de Yamashita et al. (1989), lo cual ha permitido determinar las zonas de la cadena polipeptídica implicadas en la formación de los sitios activos de la enzima.

Si bien presentan características estructurales comunes, las glutamina sintetasas de procariotas difieren ampliamente respecto a los sistemas de regulación de su actividad y nivel de síntesis. En un gran número de bacterias gram negativas, la GS puede encontrarse en dos formas, adenililada o deadenililada, con propiedades cinéticas y reguladoras distintas. El crecimiento en una fuente rica de nitrógeno determina la modificación, mediante adenililación, de la GS. Dicha modificación, consistente en la unión covalente de un resto adenilo a cada subunidad, aumenta la susceptibilidad de la enzima a ser inhibida por una serie de compuestos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, tales como la glucosamina 6-fosfato o diversos aminoácidos. Igualmente, la adenililación de la GS cambia la dependencia de cationes divalentes tanto de la actividad transferasa como de la biosintética, en concreto la actividad biosintética pasa de ser dependiente de Mg^{2+} a depender de cationes Mn^{2+} (Stadtman y Ginsburg, 1974).

La enzima encargada de adenililar y deadenililar a la GS está regulada por una proteína, P_{II} , cuya acción está regulada a su vez por una enzima encargada de uridililarla o deuridililarla. Este complejo sistema forma una cascada bicíclica de regulación que comprende, en primer lugar, un ciclo de uridililación / deuridililación de la proteína P_{II} y un segundo ciclo de adenililación / deadenililación de la GS (Stadtman y Chock, 1978). En el siguiente esquema (Figura 2) se resume este sistema de regulación:

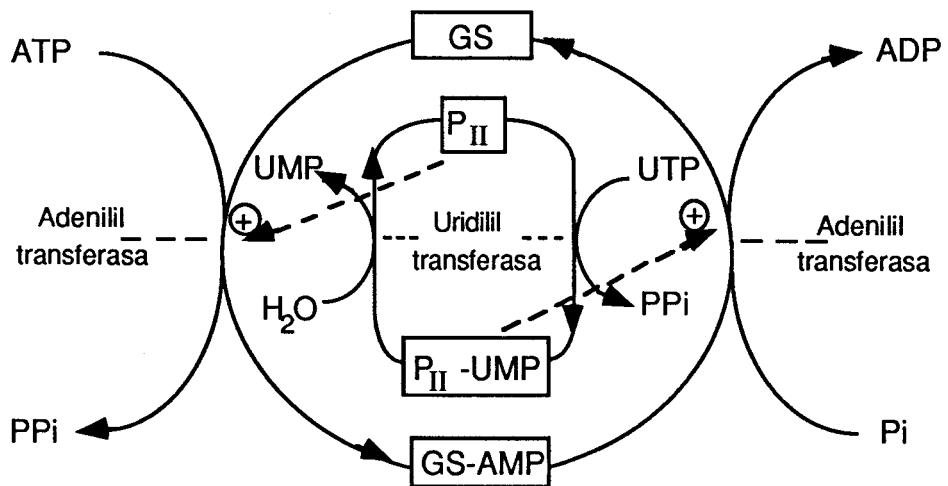


Figura 2.- Esquema de la regulación mediante una casca bicíclica de la glutamina sintetasa de *Escherichia coli*

En último término, la enzima uridililante se encuentra regulada alostéricamente por las concentraciones intracelulares de glutamina y α -cetoglutarato, de forma que un valor alto en la relación Gln / α KG determina la eliminación del grupo UMP de la proteína P_{II} y por consiguiente la adenililación de la GS. Por el contrario, una baja relación Gln / α KG provoca la uridililación de la P_{II} y la deadenilación de la GS. El balance entre las concentraciones internas de estos metabolitos es empleado por la célula como un sensor del estado de deficiencia o exceso de nitrógeno en el interior celular (Reitzer y Magasanik 1987).

Este mismo sistema de regulación ha sido descrito en especies del género de bacterias gram positivas *Streptomyces* (Streicher y Tyler, 1981; Fisher y Wray, 1989). Sin embargo, está ausente en las diversas especies del género *Bacillus* estudiadas hasta el momento (Deuel y Stadtman, 1970; Fisher et al., 1984). En este último género, la regulación de la actividad GS se realiza a través de un sistema de

inhibición alostérica por productos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, especialmente glutamina.

La proteína P_{II} citada anteriormente, interviene también en la regulación de la síntesis de la glutamina sintetasa en aquellas bacterias donde existe la cascada de regulación. Esta proteína, cuando está uridililada, permite la transcripción del gen *glnA* (gen estructural de la glutamina sintetasa) a partir del promotor *glnAp2*, un promotor dependiente del factor de transcripción $^{60}\sigma$. Por el contrario, la proteína P_{II} en su forma deuridililada detiene la transcripción a partir de este promotor, pasando el gen *glnA* a ser transcrito a partir de un promotor dependiente del factor de transcripción $^{70}\sigma$, este cambio de promotores conlleva una disminución de los niveles de proteína GS (Magasanik, 1982).

En la actualidad se dispone de información sobre la glutamina sintetasa de diversas especies de cianobacterias: de filamentosas fijadoras de dinitrógeno, pertenecientes al género *Anabaena* (Sampaio et al., 1979; Stacey et al., 1979; Tuli y Thomas, 1980; Orr et al., 198) y al género *Calothrix* (Mérida et al., 1990), filamentosas no fijadoras, pertenecientes al género *Phormidium* (Sawa et al., 1988; Blanco et al., 1989) y de la cianobacteria unicelular *Synechococcus* PCC 6301 (Florencio y Ramos, 1985). En todos los casos la GS de estos organismos presenta la típica estructura procariótica de doce subunidades dispuestas en dos anillos hexagonales.

A diferencia de lo que ocurre en el resto de las bacterias gram negativas, en las cianobacterias parece faltar el sistema de regulación en cascada descrito anteriormente; si bien estos estudios han sido realizados únicamente en especies del género *Anabaena* (Fisher et al., 1981). Dichos estudios sugieren que la

regulación de la actividad GS en cianobacterias se lleva a cabo de una forma similar a la descrita para *Bacillus*, a través de un sistema de inhibición alostérica por compuestos relacionados con el metabolismo del nitrógeno (McMaster et al., 1980; Stacey et al., 1979; Tuli y Thomas, 1980).

La síntesis de la glutamina sintetasa está también regulada en cianobacterias, detectándose menores niveles de proteína GS cuando la fuente de nitrógeno es amonio que cuando ésta es nitrato o dinitrógeno (Orr y Haselkorn, 1982; Florencio y Ramos, 1985). Turner et al. (1983) han estudiado con detalle esta regulación en la estirpe *Anabaena* PCC 7120. En esta cianobacteria la regulación de los niveles de proteína GS se lleva a cabo mediante la transcripción diferencial del gen *glnA* a partir de distintos promotores, según que la fuente de nitrógeno disponible sea el nitrógeno atmosférico o el amonio.

Actualmente se dispone de información sobre el gen *glnA* de un amplio número de bacterias, conociéndose en algunas de ellas la secuencia de nucleótidos del gen: *Escherichia coli* (Colombo y Villafranca, 1986); *Bacillus subtilis* (Strauch et al., 1988); *Streptomyces coelicolor* (Wray y Fisher, 1988); *Bacillus cereus* (Nakano et al., 1989) *Sulfolobus solfataricus* (Sanangelantoni et al., 1990) o *Anabaena* PCC 7120 (Turner et al., 1983). Estos estudios han permitido constatar la presencia en el gen de regiones altamente conservadas en todas las especies estudiadas, correspondientes a zonas de la cadena polipeptídica encargadas de formar el sitio activo o que intervienen en las interacciones necesarias para la estabilidad y actividad de la enzima (Wray y Fisher, 1988; Yamashita et al., 1989). Un dato de interés es que el codón que codifica el residuo de tirosina 397 de la cadena polipeptídica de *E. coli*, que es el residuo que sufre la adenililación (Colombo y Villafranca, 1986), se encuentra en una zona altamente

conservada en los distintos genes estudiados, presentando incluso la mayoría de las GSs estudiadas un residuo de tirosina en la misma posición, como ocurre con la enzima de *Anabaena* PCC 7120 o *Bacillus subtilis*. Sin embargo estas proteínas no son reguladas por un mecanismo de adenililación (Tumer *et al.*, 1983; Strauch *et al.*, 1988). Ni siquiera por el mecanismo de regulación de *E. coli*, como se ha podido comprobar para la GS de *Anabaena*, la cual, expresada en *E. coli* no es susceptible de ser modificada por el sistema de adenililación de esta bacteria.

En este trabajo presentamos la caracterización de la glutamina sintetasa de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* PCC 6803, describiendo su purificación, principales características cinéticas y su respuesta a la presencia de distintos compuestos relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Asimismo presentamos un estudio sobre la regulación de la actividad y síntesis de dicha enzima en respuesta al tipo de fuente de nitrógeno disponible para el organismo. Por otro lado, presentamos la clonación del gen *glnA* de esta cianobacteria y describimos la obtención de una estirpe, AM 6, derivada de *Synechocystis* que presenta integrado en su cromosoma el gen *glnA* de *Anabaena* PCC 7120. La clonación del gen permite el estudio de una serie de interesantes cuestiones acerca de la estructura y regulación de esta enzima y junto con la estirpe AM 6, puede servir en el estudio de las diferencias existentes en la regulación de la GS de *Anabaena* PCC 7120 y *Synechocystis* PCC 6803.

II. MATERIALES Y METODOS

II. A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

II. A. 1. ORGANISMOS EMPLEADOS.

II. A. 1. 1. Cianobacterias

Las cianobacterias utilizadas en este trabajo han sido *Synechocystis*, sp. PCC 6803, procedente del laboratorio de F. J. Espardellier, Gif sur Yvette (Francia) y *Synechococcus*, sp. PCC 6301 (antes *Anacystis nidulans* L-1402-1), procedente de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Göttingen. Ambas son cianobacterias unicelulares no fijadoras de dinitrógeno, pertenecientes a la Sección I de la clasificación propuesta por Rippka et al. (1979).

II. A. 1. 2. Estirpes de *Escherichia coli*

Las estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo, así como su genotipo, se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo

<u>ESTIRPE</u>	<u>GENOTIPO</u>
DH 5 α	<i>endA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA, (Nal^r)relA1, Δ(lacZYA-argF⁺)U169 (f80, lacZAM15)</i>
XL1 Blue	<i>endA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, relA1, lac⁻, [F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (tetR)]</i>
ET 6017	<i>[ara D139], Δ(argF-lac) 205, flb B 5301, pts F25, relA1, rpsL150, Δ[glnG-A o glnA-L] 229, rha-10, deoC1.</i>

II. A. 2. CONDICIONES ESTANDAR DE CULTIVO

II. A. 2. 1. Condiciones de cultivo en medio líquido

Las cianobacterias se cultivaron fotoautotróficamente en condiciones de esterilidad, utilizando recipientes de vidrio de diferentes tamaños en función del uso al que estaban destinados: a) tubos de 100 ml de capacidad, conteniendo 40 ml de medio de cultivo, para la mayoría de los estudios fisiológicos, b) frascos de fermentación de 240 ml conteniendo 130 ml de medio de cultivo para la determinación de los niveles intracelulares de algunos metabolitos, c) frascos de Roux de 1 l para la obtención de extractos celulares y algunos estudios fisiológicos

y d) botellas de 10 ó 20 l de capacidad para obtener el material de partida necesario para las purificaciones.

Para cultivar las células de *Synechocystis* PCC 6803 se empleó el medio de cultivo descrito por Herdman et al. (1973) suplementado con NaNO_3 , 20 mM ó NH_4Cl , 15 mM, como fuente de nitrógeno. El medio contenía : EDTA, 2,68 mM; MgSO_4 , 0,3 mM; CaCl_2 , 0,25 mM; Na_2CO_3 , 0,19 mM; Na_2MoO_4 , 4 μM ; NaHCO_3 , 10 mM y K_2HPO_4 , 12 mM en agua, junto con 0,5 ml de una solución de hierro-citrato y 1 ml de disolución de micronutrientes por litro de medio de cultivo. La disolución de hierro-citrato se preparó mezclando 6 g de ácido cítrico.6 H_2O con 3 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua. La solución de micronutrientes utilizada es una modificación de la solución de metales A₅ (Allen, 1968) y contenía, en 1 l de agua: H_3BO_3 , 2,86 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,252 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,222 g y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 79 mg.

Para cultivar las células de *Synechococcus* PCC 6301 se empleó un medio sintético modificado a partir del descrito por Allen y Arnon (1955). Dicho medio contenía: NaNO_3 , 20 mM; Mg SO_4 , 0,5 mM; CaCl_2 , 0,1 mM; NaCl , 2 mM; Na_2MoO_4 , 4 μM ; K_2HPO_4 , 12 mM y NaHCO_3 , 10 mM en agua. A cada litro de medio se le añadía 1 ml de disolución de Fe-EDTA y 1 ml de la disolución de micronutrientes descrita anteriormente. La solución de Fe-EDTA se preparó disolviendo 16 g de EDTA (ácido libre) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y mezclándolos con una disolución que contenía 13,7 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 364 ml de agua (Arnon et al., 1974). A través de la mezcla se burbujeaba aire durante varias horas a fin de oxidar completamente el hierro. La solución final tenía un pH aproximado de 3 y contenía 5 mg de hierro y 13 mg de potasio por ml.

Los medios, conteniendo todos sus componentes a excepción del fosfato y el bicarbonato, se colocaban en los correspondientes frascos de cultivo, tapados con algodón graso atravesado por una varilla de vidrio hueca de longitud algo superior

a la altura del frasco, y a cuyo extremo exterior se conectaba un tubo de goma parcialmente relleno de algodón graso y cerrado con pinzas. La esterilización se conseguía calentando en un autoclave Selecta (España) modelo P durante 20 min a 1 atm de presión (121°C). La solución de fosfato y bicarbonato se esterilizaba separadamente del resto del medio para evitar la precipitación de sales de fosfato y se añadía, una vez enfriada, en condiciones estériles. El crecimiento se llevaba a cabo en baños termostatzados a 35°C para *Synechocystis* y a 40°C para *Synechococcus*, bajo una iluminación continua de 25 W.m⁻², suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca. A través del medio de cultivo se burbujeaba una mezcla de aire-CO₂ en la proporción 98,5:1,5 (v/v) a fin de garantizar la agitación y el suministro de aire y fuente de carbono al cultivo. Habitualmente, 40 ml de este medio se inoculaba, en condiciones asépticas, con una cantidad de células correspondientes a 1-10 µg de clorofila, provenientes de otro cultivo en medio líquido o de uno realizado sobre medio sólido.

Las células de *Escherichia coli* se cultivaban en el medio rico Luria-Bertoni (LB) (Maniatis et al., 1982), el cual contenía en un volumen de 1 l: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, o en el medio mínimo M9 (Manatis et al., 1982) que contenía en un volumen de 1 l: Na₂HPO₄, 42 mM; KH₂PO₄, 22 mM; NaCl, 9 mM; NH₄Cl, 20 mM; MgSO₄, 2 mM, CaCl₂, 0,1 mM y 0,2 % de glucosa (estos tres últimos componentes esterilizados de forma separada) Un volumen de 5 ml de medio, una vez esterilizado en autoclave, se inoculaba con colonias de *E. coli* y se incubaba en un tubo de ensayo a 37 °C con una agitación de 150 r.p.m.

Para la infección de *E. coli* con el fago λ - ZAP II, las células se cultivaron en medio LB suplementado con maltosa a un concentración final de 0,2 %. La coinfección de la estirpe XL1-Blue con los fagos λ - ZAP II y R408 se realizó en el

medio 2xYT (Short et al., 1988), el cual constaba en un volumen de 1 l : 10 g de extracto de levadura, 16 g de bacto tripona y 10 g de NaCl.

II. A. 2. 2. Condiciones de cultivo en medio sólido

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el medio sintético denominado BG11₀ (Rippka et al., 1979) con ligeras modificaciones. Este medio contenía los siguientes nutrientes : MgSO₄, 0,30 mM; CaCl₂, 0,25 mM; NaCO₃, 2 mM; K₂HPO₄, 0,2 mM; ácido cítrico, 30 μM, citrato de hierro y amonio, 6 mg/l; EDTA-Na, 2,5 μM; 1 ml de la solución de micronutrientes descrita anteriormente y suplementado con NaNO₃, 20 mM y NaCO₃H, 10 mM. Este medio se solidificaba con agar (Bacto-agar-Difco) al 1 % (p/v).

Para la preparación de 1 l de medio sólido se preparaban dos disoluciones de 500 ml cada una conteniendo, una de ellas, 10 g de agar y, la otra, los componentes minerales necesarios para la preparación de 1 l de medio de cultivo, incluida la fuente de nitrógeno. Las disoluciones de agar y de componentes minerales se esterilizaban en autoclave tal como se ha descrito previamente y se mezclaban, antes de llenar las cajas de Petri, cuando se habían enfriado hasta una temperatura de aproximadamente 50°C. Las cajas de medio sólido (aproximadamente 30 ml de medio por caja) sembradas con las células, se incubaban, para permitir el crecimiento de éstas, en una cámara termostaticada a 30°C, con iluminación continua de luz blanca proporcionada por tubos fluorescentes con una intensidad de 25 W. m⁻². En estas condiciones una célula crecía hasta formar una colonia visible en un periodo de 5-7 días.

En el caso de *Escherichia coli*, el medio LB o M9 se suplementaba con 15 g de agar en un volumen de 1 l. El medio se esterilizaba en autoclave y, una vez enfriado hasta una temperatura de 50-60 °C, se extendía en las cajas de Petri. Para

la preparación del medio M9 el agar se autoclavaba separado del resto de los componentes del medio. En caso de que fuese necesario algún antibiótico en el medio, este se añadía antes de extenderlo en las cajas a las siguientes concentraciones finales: kanamicina, $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y ampicilina, $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

II. A. 3. RECOGIDA DE CELULAS

Cuando el volumen de células a recoger era menor de 5 l, la recogida se efectuaba por centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 min. En caso de cantidades superiores, se utilizaba un sistema de centrifugación en flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum (Sorvall, EE.UU.) a $18.000 \times g$ y 4°C . El rendimiento de los cultivos era aproximadamente de 1 g de peso fresco por litro de medio tras un periodo de 3 días de crecimiento, partiendo de inóculos del 5 % del volumen total.

II. B. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES

II. B. 1. ROTURA POR TRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS

Aproximadamente 20 g (peso fresco) de células, se resuspendían en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7, hasta un volumen final de 60 ml. La suspensión celular se sometía, a continuación, a tratamiento con ultrasonidos durante 10-15 periodos de 30 s, alternados con otros tantos de igual duración en los que se interrumpía el tratamiento a fin de evitar subidas excesivas de temperatura. Durante todo el proceso, el recipiente conteniendo las células se mantenía sumergido en un

baño de agua con hielo. Justo antes de iniciar el tratamiento de rotura, la suspensión se suplementaba con fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), preparado a una concentración de 100 mM en isopropanol, hasta una concentración final de 1 mM. Esto se hacía así debido a la gran inestabilidad de este inhibidor de proteasas en soluciones acuosas [$t_{1/2}$ de 30 min, (James, 1978)]. La frecuencia de oscilación era de 20 KHz y su potencia de aproximadamente 75 W (sonicador Branson, modelo B 12, Inglaterra). Una vez tratada con ultrasonidos, la suspensión se centrifugaba a $3.600 \times g$ durante 15 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugaba durante 15 min a $16.000 \times g$ (para eliminar restos de membrana), constituyendo el sobrenadante de esta segunda centrifugación el extracto crudo libre de células.

II. B. 2. ROTURA POR TRITURACION DE CELULAS CONGELADAS CON AIRE LIQUIDO.

En algunos experimentos donde la rotura de las células por tratamiento con ultrasonidos presentaba problemas, como pueden ser experimentos de marcaje *in vivo* con ^{32}P o aquellos que implican un volumen de suspensión celular muy pequeño (inferior o igual a 1 ml), la obtención de extractos celulares se llevó a cabo mediante congelación de la suspensión celular con aire líquido y su posterior trituración tal como describen Dzelzkalns y Bogorad (1986).

Un volumen de 40 ml de cultivo celular se centrifugaba a $3.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las células sedimentadas se resuspendían en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7, en un volumen final de 1-2 ml y se vertían a un mortero introducido en hielo el cual contenía unos 30 ml de aire líquido. Una vez evaporado éste, se trituraban las células durante 3-5 min, dejando a continuación que la

preparación se descongelara. El extracto descongelado se suplementaba con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM y se centrifugaba a $10.000 \times g$ durante 20 min a 4°C . El sobrenadante obtenido constituía el extracto libre de células.

II. C. ENSAYOS ENZIMATICOS

II. C. 1. ENSAYOS IN SITU DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA.

II. C. 1. 1. Determinación de la actividad transferasa.

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970) en células previamente permeabilizadas con el detergente MTA. Para ello, un volumen de cultivo equivalente a 10-15 μg de clorofila se centrifugaba a $12.000 \times g$ durante 1 min en centrífuga Eppendorf y las células se resuspendían en 0,85 ml de una mezcla de ensayo que contenía: tampón HEPES-NaOH, 56 μmol , pH 7; L-glutamina, 34 μmol ; MnCl_2 , 3,4 μmol y ADP, 0,425 μmol . A esta suspensión se le añadían 0,1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 20 μl de una solución de MTA al 1,25 % en H_2O . Después de agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se iniciaba por adición de 20 μmol de Na_2HAsO_4 disueltos en 50 μl de H_2O . Los blancos se obtenían con ensayos paralelos a los que se añadía agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubaba durante 5 min a 30°C . La reacción se detenía por adición de 2 ml de una solución de FeCl_3

en medio ácido, reactivo revelador del γ -glutamil hidroxamato producido en la reacción (ver apartado.II. E. 6).

Una unidad de actividad transferasa de la glutamina sintetasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de γ -glutamil hidroxamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

II. C. 1. 2. Determinación de la actividad biosintética.

Se siguió el método descrito por Marqués et al (1989). Para ello se centrifugaba un volumen de cultivo celular equivalente a 20 μ g de clorofila a 12.000 x *g* durante 1 min a temperatura ambiente, y las células sedimentadas se resuspendían en 0,9 ml de una mezcla de ensayo que contenía: tampón HEPES-NaOH, 45 μ mol, pH 7; MgCl₂, 25 μ mol; NH₄Cl, 10 μ mol y L-glutamato monosódico, 25 μ mol. Tras añadir 20 μ l de MTA al 1,25 % en agua y agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se iniciaba por adición de 0,1 ml de ATP 60 mM preparado en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7. A los 0 y 15 min de incubación a 30°C, se tomaba una fracción alícuota de 0,25 ml a la que se añadían 0,15 ml de HCl 1 N. Los restos celulares se eliminaban por centrifugación a 12.000 x *g* durante 4 min, tras lo cual una alícuota del sobrenadante se neutralizaba con fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 hasta un volumen de 2,5 ml. Las concentraciones de glutamato y glutamina en esta solución se determinaban posteriormente según se indica en el apartado II. E. 1.

II. C. 2. ENSAYO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA

II. C. 2. 1. Determinación de la actividad transferasa.

La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 0,80 ml: tampón HEPES-NaOH, 56 μmol , pH 7,0; L-glutamina, 34 μmol ; MnCl_2 , 3,4 μmol y ADP, 0,425 μmol . A esta solución se le añadía 0,1 ml de la mezcla hidroxilamina/NaOH descrita previamente (apartado II. C. 1. 1.) y una cantidad apropiada de enzima glutamina sintetasa. La reacción se iniciaba por la adición de 50 μl de una solución de Na_2HAsO_4 0,4 M. A los 5 min de incubación a 30°C la reacción se detenía añadiendo 2 ml de una solución de FeCl_3 en medio ácido (ver apartado II. E. 6.).

II. C. 2. 2. Determinación de la actividad biosintética.

Se siguió el método descrito por Marqués et al. (1989). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 0,9 ml: tampón HEPES-NaOH, pH 7,0; 45 μmol ; MgCl_2 , 25 μmol ; NH_4Cl , 10 μmol y L-glutamato monosódico, 25 μmol y una cantidad apropiada de enzima glutamina sintetasa. La reacción se iniciaba por adición de 0,1 ml de ATP 60 mM preparado en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7. A los 0 y 15 min de incubación a 30°C se tomaba una fracción alícuota de 0,25 ml a la que se añadía 0,15 ml de HCl 1 N, se centrifugaba a 12.000 x g durante 4 min y una fracción del sobrenadante se neutralizaba con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 hasta un volumen final de 2,5 ml. Las concentraciones de glutamato y glutamina presentes en esta solución se determinaban posteriormente según se indica en el apartado II. E. 1.

II. C. 3. ENSAYO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA.

La actividad fosfatasa en extractos libres de células de *Synechocystis* PCC 6803 se determinó mediante el ensayo para fosfatasa alcalina descrito por Bergmeyer et al. (1983). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 3 ml: tampón HEPES-NaOH 150 μmol , pH 7; 4-nitrofenil fosfato, 18 μmol , MnCl_2 ó CoCl_2 , 30 μmol y una cantidad apropiada de extracto libre de células (aproximadamente 1 mg de proteína). La actividad fosfatasa se determinaba espectrofotométricamente a 30°C siguiendo el incremento de absorbancia a 405 nm debido a la producción de compuesto 4-nitrofenol a partir de 4-nitrofenil fosfato, empleando un coeficiente de extinción de 18,5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

II. D. TECNICAS EXPERIMENTALES

II. D. 1. TECNICAS EXPERIMENTALES BIOQUIMICAS

II. D. 1. 1. CROMATOGRAFIAS EN COLUMNA

II. D. 1. 1. 1. Cromatografía de intercambio iónico

Se empleó DEAE-celulosa microgranular DE-52 (Whatman, Gran Bretaña) equilibrada inicialmente en tampón concentrado (HEPES-NaOH 0,5 M, pH 7,0) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. Otras condiciones de utilización son las indicadas por el fabricante. La columna utilizada era de vidrio, de 2 cm de diámetro, empaquetada hasta aproximadamente 10 cm de

altura. Antes de montar las columnas, el aire disuelto en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminaba por succión mediante una bomba de vacío .

Las muestras se aplicaban directamente sobre el lecho con pipeta de vidrio. El flujo de solvente en las columnas se regulaba por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10.200 de cabezas reductoras interconvertibles. Las fracciones del eluato se recogían automáticamente con un colector LKB modelo Ultrac 7000.

II. D. 1. 1. 2. Cromatografía de afinidad en gel de 2',5'-ADP-Sefarosa.

Se utilizó una Econo-column de BIO-RAD, de 1 cm de diámetro empaquetada hasta una altura de 6 cm. Antes de su uso, los geles se equilibraban en la columna con 7 volúmenes de tampón HEPES-NaOH 50 mM pH 7,0. Para su reutilización los geles se lavaban en las columnas con 5 volúmenes de lecho de tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,0 suplementado con 1 M de KCl y 0,04 % de MTA y posteriormente se reequilibraba en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,0.

II. D. 1. 2. ELECTROFORESIS

II. D. 1. 2. 1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico

Las electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970), en geles de acrilamida, utilizando un aparato Mini protean II dual slab cell de BIO-RAD (EE.UU.).

Para preparar los geles al 12 % de acrilamida, se mezclaban 4 ml de una solución de acrilamida al 30 % y bis-acrilamida al 0,8 % con 2,5 ml de tampón Tris-

HCl 1,5 M, pH 8,8; 0,1 ml de una solución de SDS al 10 %; 5 μ l de TEMED; 3,35 ml de agua destilada y 50 μ l de una solución de persulfato amónico al 10 % (p/v) recién preparada. Una vez polimerizado, el gel se recubría con una pequeña capa (1-1,5 cm de altura) de gel de empaquetamiento conteniendo 4 % de acrilamida y en el que se había sustituido el tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 por Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.

Las muestras se mezclaban con volúmenes iguales de tampón de muestras, el cual contenía, en un volumen de 5 ml: 0,625 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 ; 0,5 ml de glicerol; 1 ml de una solución de SDS al 10 % (p/v); 0,25 ml β -mercaptoetanol; 0,125 ml de una solución de azul de bromofenol al 0,05 % (p/v) y 2,5 ml de agua destilada. Dichas mezclas se calentaban a 100°C durante 5 min y, una vez enfriadas, se aplicaban entre 20 y 30 μ l de muestra por pocillo. La electroforesis se desarrollaba a temperatura ambiente, manteniendo un voltaje constante de 200 V durante 50 min aproximadamente. Como tampón de electrodo se empleaba Tris (3 g/l)-Glicina (14,4 g/l), pH 8,3, conteniendo SDS al 0,1 %.

Tinción de proteína en geles de poliacrilamida.-

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaban tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R al 0,25 % en 9 % (v/v) de ácido acético y 45 % (v/v) de metanol en agua. Tras 30 min de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaban repetidas veces en una solución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) en agua, tras lo cual las proteínas se visualizaban como bandas de color azul. Los geles una vez teñidos se conservaban en agua destilada.

II. D. 1. 2. 2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se realizaron siguiendo el mismo método descrito en el apartado anterior aunque se omitió el SDS tanto en los geles como en el tampón de electrodo y muestras. También se eliminó el calentamiento a 100 °C de las muestras. El porcentaje de acrilamida empleado fue del 6,5 % y las electroforesis se llevaban a cabo a una temperatura de 4 °C

II. D. 1. 2. 3. Immunolectroforesis en presencia de Triton X-100

Las immunolectroforesis se realizaron según el método de Laurell y McKay (1981) excepto que el tampón usado fue glicina 100 mM, Tris 37.5 mM, pH 8,6, suplementado con Tritón X-100 al 1 %. A 25 ml de una solución de agarosa al 1 % en el tampón antes descrito, fundida y mantenida a 56°C, se le añadían 90 µl de una preparación de anticuerpos monoespecíficos contra la GS purificada de *Synechococcus* PCC 6301. Seguidamente se extendía sobre una placa de polyester de 11,5 x 12,5 cm precalentada a 30-40°C. Una vez gelificada la agarosa, se practicaban de 4 mm de diámetro a unos 20 mm del borde de la placa en el lado correspondiente al polo negativo. Tras aplicar 10 µl de muestra por pocillo, la electroforesis se llevaba a cabo en un sistema de immunolectroforesis FBE-3000 de Pharmacia (Suecia), a 5 V/cm durante 16 h a 10°C. Una vez finalizada, el gel se secaba colocando encima unas 8 capas de papel de filtro, todo ello presionado por un peso de aproximadamente 0,5 Kg. Este proceso de secado se repetía 2 veces. El gel se sometía a continuación a lavados de 20 min a temperatura ambiente cada uno, el primero con una solución de NaCl, 0,15 M y el segundo con agua destilada. Se volvía a secar con papel de filtro y se teñía durante 10 min tal como se describe

en el apartado II. D. 1. 2. 1. Una vez desteñido, el gel se secaba exponiéndolo a una corriente de aire a temperatura ambiente.

La cantidad de proteína GS de las muestras se estimaba comparando su área de inmunoprecipitación con aquellas de enzima purificada usada como patrón.

II. D. 1. 2. 4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las electroforesis analíticas en geles de agarosa para separar fragmentos de ADN se hacían según el método descrito por Maniatis et al. (1982), usando geles con una concentración de agarosa comprendida entre el 0,5 y el 0,8 %, según el tamaño del ADN analizado, en un aparato GN-100 para geles de 10,5 x 8 cm y GN-200 para geles de 20 x 20 cm (Pharmacia, Suecia). El gel se preparaba calentando la solución de agarosa hasta su fusión, y una vez enfriado hasta 50-60 °C, se le añadía bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml de gel. Se extendía sobre la bandeja del aparato de electroforesis y se dejaba que gelificara. El volumen de muestra aplicada oscilaba entre 6 y 10 µl para los geles de menores dimensiones y 15-20 µl para los mayores. La electroforesis se desarrollaba a un voltaje constante de 65 V. El tampón de electrodo usado era el denominado TBE (Maniatis et al., 1982) compuesto por Tris, 89 mM; Borato, 89 mM y EDTA, 8 mM. En los casos en los que se deseara extraer algún fragmento de ADN del gel de agarosa, el tampón de electroforesis se sustituía por TAE, compuesto por Tris-acetato, 40 mM y EDTA, 2 mM.

II. D. 1. 3. IMMUNOPRECIPITACION

Cantidades crecientes de anticuerpos monoespecíficos de conejo obtenidos contra GS pura de *Synechocystis* PCC 6803 , *Synechococcus* PCC 6301o *Calothrix* PCC 7601, se añadían a muestras de 0,3 ml conteniendo aproximadamente 30 µg de GS pura en tampón PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM, KH₂PO₄, 1,5 mM y Na₂HPO₄, 0,1 mM). Las mezclas se incubaban durante 15 min a 30°C y después durante una noche a 4°C. Después de la incubación las muestras se centrifugaban a 10.000 x g durante 10 min a 4°C y el grado de inmunoprecipitación se calculaba midiendo la actividad GS transferasa que permanecía en el sobrenadante después de la centrifugación.

II. D. 1. 4. DOBLE DIFUSION EN GEL

Las placas para inmunodifusión pasiva se preparaban tal como describe Nilsson (1983) usando un gel de agarosa al 1 % tamponado con PBS (la composición de este tampón se detalla en el apartado anterior). Una vez fundido, se extendían unos 4 ml de gel sobre un portaobjetos de vidrio y se dejaba enfriar. Una vez gelificada la agarosa, se practicaban pocillos de 4 mm de diámetro en disposición circular alrededor de un pocillo central. En los pocillos se aplicaban 10 µl de muestra o de preparación de anticuerpo y se incubaban durante 24 h a 4°C. Por último, los geles se sometían a un proceso de secado y tinción igual al decrito en el apartado II. D. 1. 2. 1.

II. D. 1. 5. CAMBIO DE TAMPON DE LAS MUESTRAS

En los casos en que se requirió cambiar el tampón o bien eliminar las sales y moléculas pequeñas que contenía una muestra, se empleó una filtración forzada a través de Sephadex G-25 siguiendo el método de Orly y Selinger descrito por Penefsky (1977): jeringas de plástico de 1 ó 2 ml, en cuyo extremo inferior se habían colocado un círculo de papel de filtro, se llenaban con Sephadex G-25 hinchado y se equilibraban con varios volúmenes del tampón en el que se quería dejar las muestras. Las jeringas (medidas en tubos de centrifuga) se centrifugaban a 900 r.p.m. durante 2 min en centrifuga de mesa para eliminar el exceso de tampón en el gel. Un volumen de muestra de diez a veinte veces menor que el del lecho se aplicaba sobre la superficie del mismo y se centrifugaba de nuevo a 900 r.p.m. durante 2 min, recogándose en el tubo de centrifuga la muestra ya filtrada, con sólo un 10 % de incremento de volumen.

II. D. 2. **TECNICAS EXPERIMENTALES DE BIOLOGIA MOLECULAR**

II. D. 2. 1. AISLAMIENTO DE ADN DE *Synechocystis* PCC 6803

Se siguió el protocolo descrito por Dzelzkalns y Bogorad (1986). Las células se cultivaban en tubos de 100 ml con 40 ml de medio de cultivo hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 10^8 células/ml de medio. Las células de seis de estos cultivos se recogían por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se levaban tres veces con tampón Tris-HCl 50 mM suplementado con EDTA, 50 mM y NaCl, 0,15 M, pH 8,0, resuspendiéndose finalmente hasta un volumen final de 8

ml con el mismo tampón suplementado con SDS al 1 % (p/v) y acetato sódico 50 mM.

Las células de la suspensión se rompían mediante congelación con aire líquido y trituración en un mortero tal como se describe en el apartado II. B. 2. Una vez descongelado el extracto, se pasaba a tubos Corex donde se trataban 3 veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y una vez con cloroformo. En todos los casos el tratamiento consta de un buen mezclado de las soluciones, centrifugación a $13.000 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para separar las fases y recuperación de la fase superior (fase acuosa). La fase acuosa se suplementaba con acetato sódico e isopropanol (Maniatis et al., 1982) y el ADN precipitado, obtenido por centrifugación a $2.000 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavaba 2 veces con etanol al 70 % (v/v). Finalmente se resuspendía en 0,5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM suplementado con EDTA 1 mM, pH 8,0.

II. D. 2. 2. AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO DE *Escherichia coli*

Las estirpes con los plásmidos se cultivaban en 30 ml de medio selectivo (LB suplementado con antibiótico) durante una noche. La extracción de ADN se llevaba a cabo mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979), con ligeras modificaciones. Las células se recogían por centrifugación a $8.000 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y se resuspendían en 2 ml de una solución que contenía: glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM; Tris-HCl, 25 mM; pH 8,0 y 2 mg/ml de lisozima (que se añadía a la solución inmediatamente antes de utilizarse). La preparación se incubaba a temperatura ambiente durante 5 min y a continuación se enfriaba en hielo 1 ó 2 min. A la preparación enfriada se le añadía 4 ml de una solución que contenía NaOH 0,2 M y SDS al 1 %, incubándose la suspensión resultante a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$

durante 5 min. Tras añadir 3 ml de una solución de acetato potásico 5 M, pH 4,8 (mezclando bien mediante inversión del tubo) e incubar de nuevo a 0 °C durante 5 min, el lisado resultante se centrifugaba a 13.000 x *g* durante 20 min a 4 °C.

El sobrenadante se transfería a un tubo Corex y se trataba sucesivamente con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y por último con cloroformo. Finalmente la fase acuosa se precipitaba añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubando a -20 °C durante 30 min. El ADN se lavaba 3 veces con etanol al 70 % (v/v) y, tras secarlo, se disolvía en tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 8,0.

II. D. 2. 3. TRANSFORMACION DE *Synechocytis* PCC 6803

Las células de un cultivo de *Synechocystis* PCC 6803 con una concentración de clorofila de 1 µg/ml (aproximadamente 10⁷ células/ml de medio de cultivo), se recogían por centrifugación a 10.000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaban dos veces con medio BG11 (descrito en el apartado II. A. 2. 2.), resuspendiéndose finalmente en BG11 a una concentración de clorofila de 10 µg/ml. Una alícuota de 0,25 ml de la suspensión anterior se pasaba a un tubo de ensayo estéril y se le añadía entre 1 y 2 µg de ADN plasmídico, incubándose a 30 °C con agitación e iluminación durante 3 horas. Al cabo de ese periodo se diluían los cultivos usando un factor de dilución de 10³, y se sembraban sobre filtros de nitrocelulosa estériles en cajas con medio BG11 y 1 % de agar. Las cajas se incubaban a 30 °C e iluminación durante 36 h y a continuación los filtros eran transferidos a cajas de BG11 suplementadas con 20 µg de kanamicina/ml de medio de cultivo. Las cajas se incubaban a 30 °C e iluminación hasta la aparición de colonias.

II. D. 2. 4. OBTENCION DE CELULAS TRANSFORMABLES DE *Escherichia coli*

La obtención de células transformables de *Escherichia coli* se realizó siguiendo uno de los métodos descritos por Ausubel et al. (1987).

Se inoculaba 50 ml de medio LB a partir de una colonia, y se incubaba una noche a 37 °C con una agitación de 250 r.p.m. Con 4 ml de este cultivo se inoculaban 400 ml de medio Luria y se incubaban en un erlenmeyer de 2 l a 37 °C y agitación de 250 r.p.m. hasta que la densidad óptica del cultivo a 590 nm alcanzara el valor de 0,35. El cultivo se dividía en cuatro alícuotas de 100 ml, se incubaban en hielo entre 5 y 10 min y se centrifugaban a 1.600 x *g* durante 7 min a 4 °C, (todas las centrifugaciones se realizaban sin frenado). Los sedimentos obtenidos se resuspendían en 10 ml de disolución de CaCl₂ preenfriada. La solución de CaCl₂ constaba de CaCl₂, 60 mM; glicerol, 15 % (v/v) y tampón PIPES, 10 mM, pH 7. Se centrifugaban a 1.100 x *g* durante 5 min a 4 °C, se resuspendían los sedimentos en 10 ml de solución de CaCl₂ y se incubaban a 4 °C durante 30 min. Por último, se volvían a centrifugar a 1.100 x *g*, 4 °C, 5 min y los sedimentos se resuspendían finalmente en 2 ml de solución de CaCl₂ enfriada y se guardaban a -80 °C.

II. D. 2. 5. TRANSFORMACION DE *Escherichia coli*

La solución de ADN que se usaba para transformar se colocaba en un tubo de cristal y se enfriaba en hielo. Una alícuota de 100 µl de células transformables, obtenidas tal como se describe en el apartado anterior, se descongelaba lentamente y se añadía al tubo conteniendo el ADN. Tras una incubación en hielo durante 30 min, el tubo se colocaba en un baño a 42 °C durante 2 min exactos. Se le añadía 1 ml de medio LB y se incubaba a 37 °C con agitación durante 1 h.

Finalmente el cultivo se centrifugaba a $10.000 \times g$ 1 min y las células se resuspendían en 50 μ l de medio LB, los cuales se sembraban en el medio selectivo adecuado.

II. D. 2. 6. INFECCION DE *Escherichia coli* CON λ -ZAP II

La estirpe XL1-Blue se cultivó en medio LB suplementado con 0,2 % de maltosa tal como se describe en el apartado II. A. 2. 1. Una vez alcanzada por el cultivo una densidad óptica de 1 a 600 nm se tomaban 0,2 ml de dicho cultivo y se mezclaban con 100 μ l de una suspensión de fagos λ -ZAP II con un título de aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de halos/ml de suspensión. La mezcla se incubaba a 37 °C durante 35 min y a continuación se sembraban distintas diluciones de dicha mezcla en cajas de Petri de 15 cm de diámetro conteniendo LB. La siembra se realizaba añadiendo a las distintas diluciones realizadas 7 ml de agarosa de cobertera fundida y enfriada hasta una temperatura de 50 °C. La agarosa de cobertera contenía en un volumen de 1 l : 8 g de NaCl, 10 de triptona y 7 g de agarosa.

Las cajas sembradas se incubaban a 37 °C hasta observar la aparición de halos de lisis, lo cual tenía lugar, aproximadamente, después de 7 horas de incubación.

II. D. 2. 7. TRANSFERENCIA DE ADN DE FAGOS A FILTROS DE NITROCELULOSA

Una vez aparecido los halos de lisis, las cajas se incubaban durante 2 h a 4 °C y a continuación se colocaba encima de dichas cajas un filtro de nitrocelulosa asegurándose que entraba en contacto con toda la superficie del cultivo. El filtro se mantenía en contacto con el cultivo durante 2-3 min y a continuación se retiraba y se dejaba secando al aire libre durante 5-10 min. Al cabo de ese tiempo el filtro se trataba con distintas soluciones : a) NaCl, 1,5 M; NaOH, 0,5 M; b) NaCl, 1,5 M; Tris-HCl, 0,5 M pH 8,0; y c) 2 x SSC (ver apartado II. D. 2. 9. para su composición). En todos los caso el tratamiento duraba 1 min y se realizaba colocando el filtro encima de un volumen comprendido entre 5 y 10 ml de la solución respectiva, con la cara del filtro que había estado en contacto con los fagos hacia arriba, de forma que no entrara en contacto directo con las soluciones. Una vez concluido este proceso los filtros se secaban a 42 °C durante una noche con objeto de permitir la fijación del ADN al filtro de nitrocelulosa.

II. D. 2. 8 HIBRIDACION DE FILTROS DE NITROCELULOSA CON SONDA DE ADN MARCADA CON ³²P

Se realizó siguiendo el método descrito por Ausubel et al. (1987). Se colocaron los filtros en una bolsa sellable y se añadieron de 6 a 10 ml de una disolución de prehibridación, la cual contenía: fosfato potásico, 0,5 M, pH 7,2; seroalbúmina bovina, 1 %; EDTA-Na₂, 1 mM y SDS al 7 %. Se incubó entre 4 h a 50 °C.

Antes de que acabara esta incubación la sonda de ADN marcada con ³²P se hirvió durante 5 min, a continuación se enfrió rápidamente en hielo y se le añadió

entre 10 y 15 ml de disolución de prehibridación. Se cortó un extremo de la bolsa sellable y se eliminó la disolución de prehibridación, añadiéndose la que contenía la sonda radiactiva (de igual composición que la de prehibridación). El filtro se incubó una noche a 50 °C. Al final de este periodo se procedió al lavado del filtro con una disolución que contenía: fosfato potásico, 40 mM, pH 7,2; seroalbúmina bovina, 0,5 %; EDTA-Na₂, 1 mM y SDS al 5 %, se realizaron 5 lavados con un volumen de 200 ml de disolución, a temperatura ambiente y agitación. Al final de estos lavados se dejó secar el filtro al aire y se expuso a una película de autorradiografía (ver apartado II. D. 2. 12.).

II. D. 2. 9. TRANSFERENCIA DE ADN A FILTRO DE NYLON

Aproximadamente 1,5 µg de ADN cromosómico de *Synechocystis* PCC 6803 se digirió de forma total con el enzima de restricción *BamH* 1, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % durante 20 h a una intensidad de 35 mA.

La transferencia de los fragmentos de ADN desde el gel hasta el filtro de nylon se realizó según se describe en Ausubel et al. (1987). El gel se incubó durante 10 min en una disolución de HCl 0,2 N, lavándose a continuación varias veces con agua destilada. A continuación, se colocó el gel encima de una pieza de papel Whatman 3 MM, el cual tenía los extremos sumergidos en una disolución de NaOH 0,4 M. Sobre el gel se colocó el filtro de nylon y , encima del filtro, varias piezas de papel de filtro (hasta una altura de 10-15 cm). Todo el conjunto se mantuvo unido colocando un peso de aproximadamente 0,5 Kg en la parte superior de la estructura. Se permitió que tuviera lugar la transferencia a temperatura ambiente durante 12 h y al cabo de ese tiempo el filtro se lavó con una disolución 5

veces concentrada de SSC, a continuación se dejó que el filtro, con el ADN transferido a él, se secase al aire. La disolución SSC constaba de NaCl 0,15 M y citrato sódico 17 mM, pH 7,0.

II. D. 2. 10. HIBRIDACION DE FILTROS DE NYLON CON SONDA DE ADN MARCADA CON ³²P

Se realizó siguiendo el método descrito por Ausubel et al. (1987). Se colocó el filtro en una bolsa sellable y se añadieron de 6 a 10 ml de una disolución de prehibridación, la cual contenía: fosfato potásico, 25 mM, pH 7,4; NaCl, 0,75 M; citrato sódico, 85 mM; ficol, 0,1 %; polivinil-pirrolidona, 0,1 %; seroalbúmina bovina 0,1 %; esperma de salmón, 50 µg/ml y SDS al 1 %. Se incubó entre 2 y 4 h a 42 °C.

Antes de que acabara esta incubación la sonda de ADN marcada con ³²P se hirvió durante 5 min, a continuación se enfrió rápidamente en hielo y se le añadió entre 10 y 15 ml de disolución de prehibridación. Se cortó un extremo de la bolsa sellable y se eliminó la disolución de prehibridación, añadiéndose la que contenía la sonda radiactiva. El filtro se incubó una noche a 42 °C. Al final de este periodo se procedió al lavado del filtro con las siguientes disoluciones: SSC x 2 y suplementado con SDS al 0,1 %, (5 min a temperatura ambiente); SSC x 2, SDS al 0,1 % (15 min a temperatura ambiente); SSC x 0,5, SDS al 0,1 % (15 min a temperatura ambiente); SSC x 0,1, SDS al 0,1 % (15 min a temperatura ambiente) y SSC x 0,1, SDS al 1 % (30 min a 42 °C). Al final de estos lavados se dejó secar el filtro al aire y se expuso a una película de autorradiografía (ver apartado II. D. 2. 12.).

II. D 2. 11. MARCAJE DE LA SONDA DE ADN CON ^{32}P

Se empleó el "Nick translation Kit" suministrado por Boehringer Mannheim (RFA), siguiendo las instrucciones recomendadas por dicha firma comercial.

Una cantidad de ADN comprendida entre 0,1 y 0,2 μg de ADN se mezcló con 3 μl de una solución que contenía 0,4 nmol de dATP, dGTP y dTTP; 2 μl de un tampón concentrado 10 veces suministrado por la casa comercial, 2 μl de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (aproximadamente 28 μCi) y 2 μl de solución de enzima que contenía una mezcla de ADN polimerasa I y ADN asa I en 50 % de glicerol (v/v). La solución se incubó a 15 °C durante 35 min, y la reacción se detuvo añadiendo 2 μl de una solución de EDTA 0,2 M, pH 8,0 y calentándola a 65 °C durante 10 min. Los deoxirribunucleótidos trifosfatados no incorporados se eliminaron mediante filtración a través de un gel Sephadex G-50 (Pharmacia, Suecia). Para ésta filtración se usaron pequeñas columnas de plástico suministradas por Boehringer Mannheim y que contenían aproximadamente 2 ml de gel Sephadex G-50 (Pharmacia). La filtración se realizó siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

La cuantificación de la radioactividad incorporada en el ADN usado como sonda se hizo de la siguiente forma: al inicio de la reacción de marcaje se tomó una alícuota de la mezcla de reacción de 1,5 μl que se colocó en un pequeño filtro circular de papel Whatman GF/A, previamente humedecido con 20 μl de agua, y al final de la reacción se tomaron otras dos alícuotas de 1,5 μl cada una. La alícuota tomada al inicio de la reacción y una de las tomadas al final se sometieron a un lavado con objeto de eliminar el marcaje presente en el filtro debido a moléculas de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP libres. Los filtros se lavaron 5 veces con 20 ml de $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ al 5 %, a continuación se lavaron 2 veces con agua destilada y por último, dos veces con etanol. Los filtros lavados se dejaron secar al aire. La radioactividad presente en los tres filtros se determinó en un contador de centelleo tal como se detalla en el

apartado II. E. 9. El porcentaje de incorporación se determinó calculando el siguiente cociente:

$$\frac{\text{c.p.m. final, lavado} - \text{c.p.m. inicial}}{\text{c.p.m. final, sin lavar} - \text{c.p.m. inicial}}$$

II. D. 2. 12. DETECCION MEDIANTE AUTORRADIOGRAFIA DE ADN MARCADO CON ³²P

Una vez concluida la hibridación con la sonda de ADN marcada con ³²P, la radioactividad se detectó exponiendo al filtro una película de alta sensibilidad (VALCA, modelo rápida 90''). La exposición se realizó a -70 °C durante un periodo comprendido entre 12 y 24 h (en caso de no obtener una buena impresión, este tiempo se aumentó, aunque en nuestras condiciones nunca excedió de 48 h de exposición). La película expuesta se reveló empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por la firma comercial VALCA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

II. D 2. 13. HIBRIDACION CON SONDA DE ADN MARCADO CON DIGOXIGENINA

El filtro de nylon se colocó en una bolsa sellable y se le añadieron 20 ml de una disolución de prehibridación compuesta de SSC (ver composición en el apartado anterior) concentrada 5 veces y formamida al 50 % (v/v). Se incubó durante 3 h a 37 °C.

La sonda marcada con digoxigenina se hirvió durante 10 min, se enfrió rápidamente en hielo, y se le añadió 20 ml de disolución de prehibridación. Se cortó un extremo de la bolsa sellable, eliminando la disolución de prehibridación y sustituyéndola por la que contenía el ADN marcado. Se incubó una noche a 30 °C y a continuación se lavó 2 veces con una disolución de SSC x 2 durante 10 min y otras dos con SSC x 1, en ambos casos los lavados se hicieron a temperatura ambiente. Una vez finalizado el lavado, el marcaje con digoxigenina se detectó tal como se describe en el apartado II. D. 2. 15.

II. D. 2. 14. MARCAJE DE LA SONDA DE ADN CON DIGOXIGENINA

Se usó para ello el "Kit de marcaje al azar de ADN con digoxigenina-dUTP" de la firma comercial Boehringer Mannheim (RFA), siguiendo las instrucciones recomendadas por dicha firma.

Aproximadamente 1 µg de ADN se mezcló con las siguientes soluciones: 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos (concentrada 10 veces) proporcionada por el "kit"; 2 µl de una mezcla de deoxirribonucleótidos trifosfatos (concentrada 10 veces) que contiene dATP, 1 mM; dCTP, 1 mM; dGTP, 1mM; dTTP, 0,65 mM y digoxigenina-dUTP, 0,35 mM, pH 6,5; 19 µl de agua destilada y por último, 1 µl de una disolución que contenía el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. Esta mezcla se incubó durante 5 h a 37 °C, parando la reacción por la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M, pH 8,0.

El ADN marcado con digoxigenina se purificó por precipitación añadiendo 2,5 µl de una disolución de LiCl 4 M y 75 µl de etanol frío e incubando a -70 °C durante 20 min. El precipitado se recuperó mediante centrifugación a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C y se lavó dos veces con etanol frío al 70 %. Por último el

precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 50 μ l de una disolución que contenía Tris-HCl, 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 8,0 y esperma de arenque a una concentración de 50 μ g/ml.

II. D. 2. 15. DETECCION INMUNOLOGICA DE ADN MARCADO CON DIGOXIGENINA

El filtro, una vez acabada la hibridación con la sonda marcada, se lavó a temperatura ambiente durante 1 min con una disolución de Tris-HCl, 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (tampón A).

Se sumergió en 100 ml de reactivo bloqueante (suministrado por el "kit" citado en el apartado anterior) al 0,5 % (p/v) en el tampón A, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó durante 1 min con tampón A y se incubó con 20 ml de una disolución de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, a una concentración de 150 mU/ml, durante 30 min a temperatura ambiente.

El filtro se lavó dos veces incubándolo con agitación durante periodos de 15 min en 100 ml de tampón A para eliminar el anticuerpo conjugado no fijado. Una vez lavado, el filtro se equilibró incubándolo durante 2 min en 20 ml de tampón Tris-HCl 80 mM, pH 9,5. Por último se incubó, en ausencia de luz, en una disolución compuesta de 45 μ l de NBT [disolución de sal azul de nitrotetrazolio, 75 mg.ml⁻¹ en dimetilformamida al 70 % (v/v)] y 35 μ l de X-fosfato [disolución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, 50 mg.ml⁻¹ en dimetilformamida al 70 % (v/v)]; disueltos en 10 ml de Tris-HCl 80 mM, pH 9,5, preparada momentos antes de usarla. Se dejó incubando en ésta disolución, en ausencia de luz, hasta que el color apareció suficientemente nítido.

II. D. 2. 16. EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

La extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó usando el "kit" GeneClean de la firma comercial BIO 101 Inc., siguiendo las instrucciones recomendadas por dicha firma.

Se cortaba el fragmento de gel que contenía la banda deseada y se le añadía 2 veces su volumen de una disolución de NaI 4 M (para calcular el volumen del fragmento de agarosa se asumía una densidad de 1 y se determinaba el peso del fragmento). La preparación se incubaba a 55 °C durante 5-10 min, al final de esta incubación todo la agarosa debía estar fundida. A continuación se le añadía entre 5 y 10 μ l (dependiendo de la cantidad de ADN que se extrajese) de "glass milk", disolución proporcionada por el "kit", y se incubaba a 4 °C durante 15 min con agitación ocasional. Al cabo de ese tiempo se centrifugaba la preparación durante 10 s a 10.000 x *g* y el precipitado obtenido, formado por perlas de vidrio a las que estaba adherido el ADN, se lavaba 4 veces con una disolución suministrada por la firma comercial y que contenía NaCl, Tris, EDTA y etanol. Por último, el precipitado se resuspendía en un volumen apropiado de tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 (normalmente entre 10 y 30 μ l), se calentaba durante 5 min a 55 °C, se centrifugaba a 10.000 x *g* , 10 s y se recuperaba el sobrenadante

II. D. 2. 17 LIGACION DE FRAGMENTOS DE ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se llevaban a cabo en un volumen 10 μ l, conteniendo: 1 μ l de tampón de ligación concentrado 10 veces (Tris-HCl, 0,5 M, pH 7,4; MgCl₂, 0,1 M; ditiotreitól, 0,1 M; espermidina, 10mM; ATP, 10 mM y BSA, 1 mg/ml), 7 μ l de la mezcla de fragmentos de ADN que se deseaban

ligar y 2 μ l de una preparación de enzima ADN ligasa del fago T4, con 5 unidades Weiss/ μ l (Pharmacia). La mezcla de reacción se incubaba a 15 °C durante una noche.

II. D. 2. 18. RESTRICCIÓN DE ADN

Para las reacciones de restricción de ADN se empleaban las enzimas suministradas por la firma Boehringer Mannheim (RFA), usando el tampón de restricción adecuado a cada enzima, suministrado por la misma firma. En todos los casos, el volumen de solución de enzima añadido al ensayo era menor de 1/10 del volumen total de reacción, con objeto de evitar una inhibición de la actividad debida al glicerol presente en la solución de la enzima.

II. E. MÉTODOS ANALÍTICOS

II. E. 1. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE GLUTAMATO Y GLUTAMINA MEDIANTE HPLC.

El sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) empleado para el análisis de aminoácidos en el ensayo de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa tanto *in vivo* como *in vitro* estaba compuesto por un inyector automático W.I.S.P. 710 B de Waters (EE.UU.) conectado a una bomba Waters modelo 6000 A que creaba un flujo constante de solvente. La salida del inyector estaba conectada a la columna de análisis (precedida de una precolumna de protección rellena de

perlas de vidrio), y ésta a su vez con un detector de fluorescencia Ac-420 de Waters provisto de filtros de 338 nm (excitación) y 425 nm (emisión). La temperatura de la columna se mantenía a 45°C gracias a un horno termostático Waters.

El flujo de solvente por la columna durante el tiempo de derivatización de los aminoácidos se mantenía constante gracias a una bomba auxiliar modelo M45 de Waters conectada mediante una unión en T directamente a la columna, según describe Marqués et al. (1989).

Una vez transcurridos los 90 s empleados en la derivatización, el solvente se suministraba nuevamente con la bomba A a través del inyector, arrastrando la muestra a analizar ya derivatizada. El funcionamiento de las bombas se regulaba con un controlador-formador de gradiente modelo M-720, y los datos obtenidos del detector se procesaban directamente en la unidad de procesamiento de datos M-730, ambos de Waters.

Derivatización de los aminoácidos.-

Las muestras de los ensayos enzimáticos obtenidas como se indica en los apartados II. C. 1. 2. y II. C. 2. 2., se derivatizaban antes de su inyección, siguiendo el método de Lindroth y Mopper (1979). En el caso concreto de la inyección automática, la derivatización se llevaba a cabo en el inyector, que transportaba, con flujo muy lento (0,1 ml/min), 20 µl de mezcla derivatizante y 10 µl de muestra tomados consecutivamente, hasta una precolumna de 4 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno rellena de perlas de vidrio, donde permanecían durante 45 s antes de ser inyectados.

La mezcla derivatizante constaba de: 27 mg de O-ftaldialdehído (OPA) disueltos en 0,5 ml de metanol; 4,5 ml de tampón borato sódico 0,4 M, pH 10 y 20 µl de β-mercaptoetanol.



Desarrollo de la cromatografía.-

La cromatografía en fase reversa de los OPA-derivados así obtenidos se llevaba a cabo de forma isocrática empleando una columna de octadecilsilano fijado en soporte de sílice tipo μ BONDAPACK C₁₈ o NOVAPACK C₁₈, ambas de Waters (EE.UU.), de 15 cm de longitud por 3,9 mm de diámetro interno, precedida por una precolumna (descrita anteriormente). Las condiciones de elución eran una modificación de las de Martin et al. (1982). El tampón empleado era fosfato sódico, 20 mM, pH 6,5 conteniendo 22 % de metanol y 2 % de tetrahidrofurano, bombeado a través de la columna a un flujo constante de 1 ml.min⁻¹, creando una presión de aproximadamente 2400 psi. Los picos correspondientes a los OPA-derivados de glutamato y glutamina se eluían con una diferencia mayor de 1 min en sus tiempos de retención, resolviéndose totalmente.

El calibrado del sistema se llevaba a cabo automáticamente con el procesador de datos M-730 tras inyectar un patrón de concentración conocida de glutamato y glutamina tratado del mismo modo que las muestras. Al final de los análisis el sistema completo se lavaba con varios volúmenes de columna de agua, seguidos por una cantidad equivalente de metanol.

II. E. 2. ANÁLISIS DE NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS.

La extracción de los aminoácidos se realizaba mediante lisis ácida tal como describen Romero et al (1987). Fracciones alícuotas de 0,9 ml de un cultivo con una concentración de clorofila entre 10 y 15 μ g/ml se añadían a 0,1 ml de HCl 2 N enfriado en hielo. La mezcla se agitaba durante 10 s y se centrifugaba a 12.000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante constituía el lisado celular donde se analizaban los aminoácidos.

Del lisado celular se tomaban 0,3 ml que se tamponaban con fosfato potásico 50 mM, pH 7 hasta un volumen final de 2,5 ml. El análisis de los aminoácidos presentes en el lisado se realizaba mediante derivatización de los mismos con OPA y posterior separación en HPLC. Para ello, 50 μ l de la muestra tamponada con fosfato potásico se incubaban a temperatura ambiente durante 90 s con 150 μ l de mezcla derivatizante (descrita en el apartado anterior). Transcurrido ese tiempo se inyectaban 40 μ l de dicha mezcla en un inyector U6K de Waters (EE.UU.), conectado a una bomba Waters modelo 501. La salida del inyector estaba conectada a una precolumna de protección (rellena de perlas de vidrio) y ésta a su vez a la columna de análisis. La columna usada era una NOVAPACK C₁₈ de Waters (EE.UU.) compuesta por una matriz de octadecilsilano fijado en soporte de sílice. La columna se unía en serie a un detector de fluorescencia Ac-420 de Waters provisto de filtros de 338 nm (excitación) y 425 nm (emisión). La cromatografía se realizaba a temperatura ambiente y en condiciones isocráticas empleando como eluyente fosfato potásico 20 mM, pH 6,5, conteniendo 22 % de metanol y 2 % de tetrahidrofurano, bombeado a través de la columna a un flujo constante de 1 ml/min.

El calibrado del sistema se llevaba a cabo automáticamente con el procesador de datos 745 de Waters tras inyectar un patrón de concentración conocida de los aminoácidos estudiados tratados del mismo modo que las muestras.

II. E. 3. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE α -CETOGLUTARATO EN *Synechocystis* PCC 6803

La determinación de los niveles intracelulares de α -cetoglutarato en *Synechocystis* PCC 6803 se realizaba siguiendo el método empleado por Senior (1975) en *Escherichia coli*.

Las células de 130 ml de un cultivo celular, con una concentración de clorofila comprendida entre 8 y 12 $\mu\text{g/ml}$, se recogían por centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las células sedimentadas se resuspendían en una disolución de ácido perclórico 0,4 M hasta un volumen final de 1-1,5 ml y se incubaban en hielo durante 15 min para permitir un completo lisado de las células. La suspensión celular se centrifugaba a $12.000 \times g$ durante 20 min a 4°C y el sobrenadante obtenido constituía el lisado celular donde se determinaba la concentración de α -cetoglutarato.

Esta determinación se realizaba midiendo la oxidación del NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato con cantidades limitantes de este último. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl, pH 8, 200 μmol ; NH_4Cl , 60 μmol ; ADP, 2 μmol ; NADPH, 0,1 μmol y 0,4 ml de muestra. Al añadir la muestra se formaba un precipitado, probablemente debido al ácido perclórico y el tampón Tris-HCl, este precipitado interfería con la medida y se eliminaba mediante centrifugación de la mezcla de reacción a $12.000 \times g$ durante 2 min a temperatura ambiente. Una vez eliminado el precipitado se iniciaba la reacción por la adición de 10 μl de una preparación de glutamato deshidrogenasa ($1,2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se seguía la oxidación del NADPH en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP8-100 UV con registrador incorporado, a una longitud de onda de 340 nm. El coeficiente de extinción empleado para el NADPH a esa longitud de onda era de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II. E. 4. DETERMINACION DE CLOROFILA

El contenido celular de clorofila *a* se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos de las células (Mackinney, 1941). La suspensión celular (0,5 a 1 ml) se centrifugaba 1 min a 12.000 x *g* en una centrífuga Eppendorf y el sedimento se resuspendía con 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 1 min, la preparación se centrifugaba de nuevo 2 min a 12.000 x *g*, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante, adecuadamente diluido con metanol, a partir de su absorbancia a 665 nm. El coeficiente de extinción empleado a esa longitud de onda era de 74,46 mM⁻¹.cm⁻¹.

II. E. 5. DETERMINACION DE PROTEINA

El contenido celular de proteína se determinaba directamente en células enteras siguiendo la modificación de Markwell et al.(1978) al método de Lowry et al. (1951). En los procesos de purificación de enzimas y cuando se trabajaba con extractos crudos, la proteína se determinaba siguiendo el método de Bradford (1976) usando el reactivo para proteínas BIORAD (EE.UU.) y siguiendo el procedimiento de "microensayo" recomendado por dicha firma comercial : la muestra se completaba hasta 0,8 ml con agua y se añadían 0,2 ml de reactivo para proteínas BIORAD determinándose la absorbancia de dicha mezcla a 595 nm. Las rectas de calibrado se obtenían para cada serie de ensayos, utilizando ovoalbúmina como patrón.

II. E. 6. DETERMINACION DE γ -GLUTAMIL HIDROXAMATO

El γ -glutamil hidroxamato formado en el ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinaba por reacción con cloruro férrico en medio ácido (Shapiro y Stadtman, 1970). A 1 ml de disolución conteniendo γ -glutamil hidroxamato (mezcla de ensayo de la reacción después de 5 min de incubación a 30 °C) se le añadían 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido, cuya composición era: 7,73 ml de HCl al 37 % , 12 g de ácido tricloroacético y 33,3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ llevados a un volumen final de 1 l con agua. La concentración del producto coloreado formado se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de $0,89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II. E. 7. DETERMINACION DE AMONIO

El amonio se determinaba enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) en la reacción de síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de este último (Bergmeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl, pH 8, 100 μmol ; α -cetoglutarato, 10 μmol ; ADP, 1,2 μmol ; NADPH, 0,20 - 0,25 μmol , y una alícuota de la muestra. La reacción se iniciaba por la adición de 5 μl de una preparación de glutamato deshidrogenasa (7 U) de muy bajo contenido en amonio y se desarrollaba durante 15 min a 30°C. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción, antes y después de desarrollarse ésta, se determinaba espectrofotométricamente a 340 nm, usando un coeficiente de extinción de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido se corregían con los blancos a los que no se añadía amonio.

II. E. 8. DETERMINACION DE ADN

La cantidad de ADN se estimaba según describen Maniatis et al. (1982), a partir de la fluorescencia inducida por luz ultravioleta emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas en el ADN. Para ello, alícuotas de las disoluciones en cuestión se sometían a electroforesis en geles horizontales de agarosa (ver apartado II. D. 1. 2. 3.) en los que también se incluían distintas muestras conteniendo cantidades conocidas de ADN del fago λ . Una vez desarrollado la electroforesis, se fotografiaban mientras se sometían a iluminación con luz de 302 nm de longitud de onda. La cantidad de ADN en la muestra problema se estimaba por comparación de su fluorescencia con la de las muestras patrones.

II. E. 9. DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD DE ^{32}P

La determinación de radioactividad de ^{32}P se realizaba en un contador de centelleo líquido Beckman modelo 2800. Las muestras, colocadas en viales de centelleo de 7 ml, y tratadas como se indica en el apartado II. D. 2. 7., se mezclan con 5 ml de solución centelleadora (cocktail 2200, Scharlau).

II. E. 10. CENTRIFUGACIONES

Para la recogida de células y en la preparación de extractos celulares, se emplearon centrifugas refrigeradas Sorvall (EE.UU.) modelo RC2-B, equipadas con rotores SE-12, SS-34 y GSA.

Para la recogida de células de suspensiones de volúmenes inferiores a 1,5 ml, preparaciones de muestras para HPLC y centrifugaciones de volúmenes

menores de 1,5 ml, se empleó una centrífuga Eppendorf (R.F.A.) modelo 5414, capaz de alcanzar $10.000 \times g$.

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

II. E. 11. MEDIDAS DE pH

El pH de las disoluciones se determinó con el pH-metro Radiometer modelo PHM82 (Dinamarca).

II. F. REACTIVOS

II. F. 1. PROCEDENCIA DE COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIÓQUÍMICOS

ADP, aminoácetato, azaserina, DON, L-glutamato deshidrogenasa (tipo II, de hígado de vaca), L-glutamina, ácido L-glutámico, patrones de aminoácidos para HPLC, OPA, agarosa, Tritón X-100, ficol, polivinil-pirrolidona, seroalbúmina bovina (fracción V), SDS, HEPES y TRIS eran de Sigma Chemical Co., St. Louis (USA). Sephadex G-25 y G-50, agarosa carente de actividad nucleasa y ADN ligasa eran de Pharmacia (Suecia). Las enzimas de restricción, "Kit" de marcaje de ADN con ^{32}P , "Kit" de marcaje de ADN con digoxigenina, NADPH y NADH eran de Boehringer Mannheim (R.F.A.). El "Kit" Geneclean fue suministrado por BIO 101 Inc. (USA). La DEAE-celulosa DE-52 de Whatman (Gran Bretaña). El nitrato sódico,

fosfato dipotásico y bicarbonato sódico empleado en los cultivos fueron de grado analítico y suministrados por Panreac (España). El resto de los compuestos utilizados eran de grado analítico, procedentes de Merck (R.F.A.).

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

III. RESULTADOS

III. A. PURIFICACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *Synechocystis* PCC 6803

III. A. 1. METODO DE PURIFICACION

El método que describimos para la purificación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 está basado en el descrito por Florencio y Ramos (1985) para purificar la GS de la cianobacteria *Synechococcus* PCC 6301, y comprende dos pasos de cromatografía: una primera de intercambio iónico, seguida de una cromatografía de afinidad empleando una matriz de 2', 5'-ADP-Sefarosa.

Los extractos crudos se obtuvieron por tratamiento con ultrasonidos y posterior centrifugación tal como se describe en el apartado II. B. 1. En la purificación de la glutamina sintetasa de *Synechococcus* se incluye un tratamiento del extracto con un detergente no iónico (MTA), ya que sin este tratamiento aproximadamente el 50 % de la actividad GS se encuentra en el sedimento de la centrifugación, junto con las fracciones de membranas y restos celulares. En el caso de *Synechocystis* este tratamiento no fue necesario, ya que más del 90 % de la actividad GS se detectó en el sobrenadante después de la centrifugación de la preparación tratada con ultrasonidos.

Todo el proceso de purificación se llevó a cabo a temperaturas comprendidas entre 0 y 4 °C.

III. A. 1. 1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

Se empleó como paso previo a la cromatografía de afinidad en 2', 5'-ADP-Sefarosa, con objeto de obtener preparaciones más limpias para aplicar en ese

proceso, y eliminar proteínas que pudieran competir por la unión a la columna de afinidad.

Se utilizó un lecho de DEAE-celulosa Whatman DE-52 (2 x 10 cm) formado a partir de unos 10 g (peso seco) de matriz equilibrada con tampón HEPES-NaOH, 50 mM, pH 7 (tampón A) y empaquetada en una columna de vidrio a un flujo de 96 ml/h. El extracto crudo libre de células se aplicó sobre el lecho a un flujo de 52 ml/h, tras lo cual se lavó la columna con 4 volúmenes de lecho de tampón A. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron a continuación con un gradiente lineal de KCl en tampón A (desde 0 a 0,5 M y 200 ml de volumen total) a un flujo de 52 ml/h. La actividad GS se eluyó como un solo pico a una concentración de KCl de 0,3-0,35 M (Figura 3), formando parte de una banda de color azul intenso debido a su alto contenido en ficocianinas, un pigmento fotosintético característico de cianobacterias. Las fracciones con suficiente actividad se reunieron y se diluyeron con tampón A hasta una concentración final de KCl de 50 mM con objeto de que la fuerza iónica de la muestra no interfiriera en la unión de las proteínas a la matriz de afinidad 2', 5'-ADP-Sefarosa. Es preferible diluir la muestra ya que, al igual que ocurre en otras cianobacterias (Stacey *et al.*, 1979), la glutamina sintetasa perdía la actividad al ser dializada contra el tampón A.

La actividad GS recuperada tras la elución de la columna representó un 80 % de la actividad total aplicada, con una purificación de aproximadamente 2,5 veces. Si bien la purificación obtenida en este paso fue pequeña, esta cromatografía permitió un mejor rendimiento de la cromatografía de afinidad, al eliminar proteínas que podrían saturar la columna de 2', 5'-ADP-Sefarosa.

III. A. 1. 2. Cromatografía de afinidad en gel de 2', 5'-ADP-Sefarosa

Se utilizó un lecho de 2', 5'-ADP-Sefarosa (Pharmacia) de 1 x 6 cm, formado a partir de 1 g (peso seco) de adsorbente equilibrado con tampón A y empaquetado en una columna Econo-column de BIO-RAD a un flujo de 52 ml/h.

La muestra resultante de la cromatografía en DEAE-celulosa, una vez diluida, se aplicó sobre el lecho a un flujo de 52 ml/h tras lo cual se lavó la columna con 300 ml de tampón A suplementado con KCl a una concentración final de 0,4 M. Con este lavado se consiguió eluir de la columna todas las ficocianinas sin que se detectase actividad GS en las fracciones de elución recogidas.

Una vez concluido el lavado, se aplicó a la columna tampón A suplementado con KCl 0,4 M y ADP 2 mM a un flujo de 26 ml/h, recogiendo fracciones de 1 ml. La actividad GS se eluyó como un solo pico en las primeras fracciones recogidas (Figura 4), representando esta actividad más del 90 % de la aplicada a la columna, con una purificación media de 130 veces. Las fracciones con actividad GS se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, descartándose aquellas que presentaban alguna banda de proteína contaminante.

La Tabla 2 resume el proceso de purificación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*. La recuperación fue del 42 % de la actividad enzimática original, siendo la purificación total de unas 250 veces. La actividad específica de la preparación final obtenida fue de aproximadamente 143 U de actividad transferasa por mg de proteína.

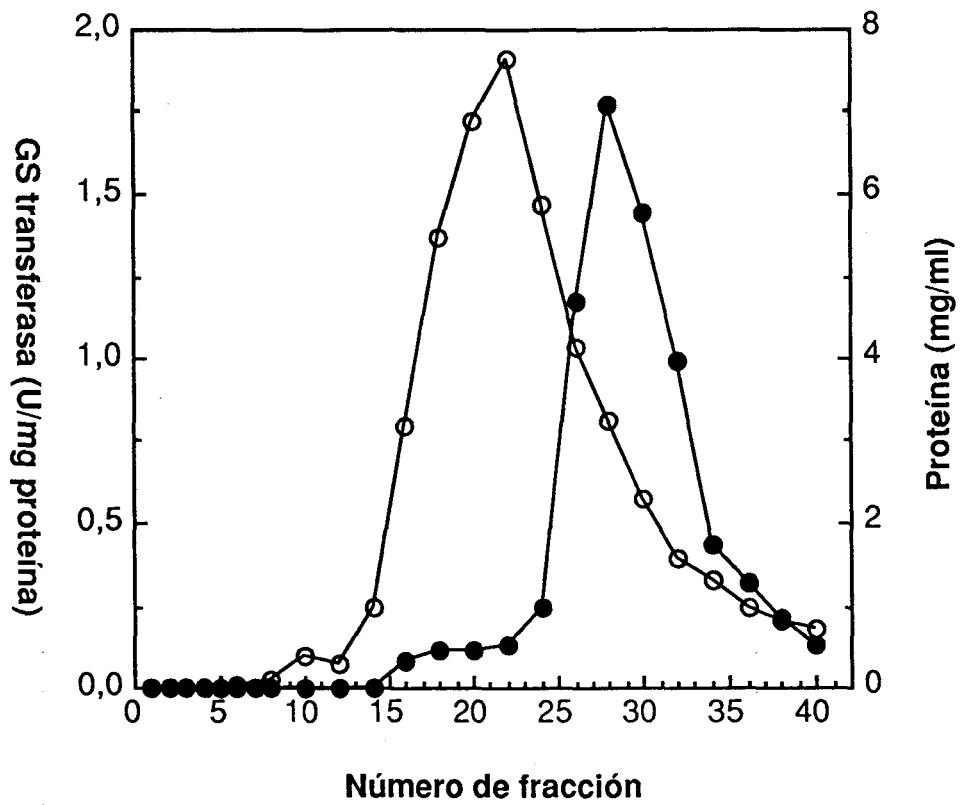


Figura 3.- Perfil de elución de la actividad glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 de una columna de DEAE-celulosa

Las condiciones de la cromatografía se indican en el apartado III. A. 1. 1. Se aplicó una muestra de 20 ml conteniendo 120 U de actividad transferasa.

(— ○ —) proteína; (— ● —) actividad GS transferasa

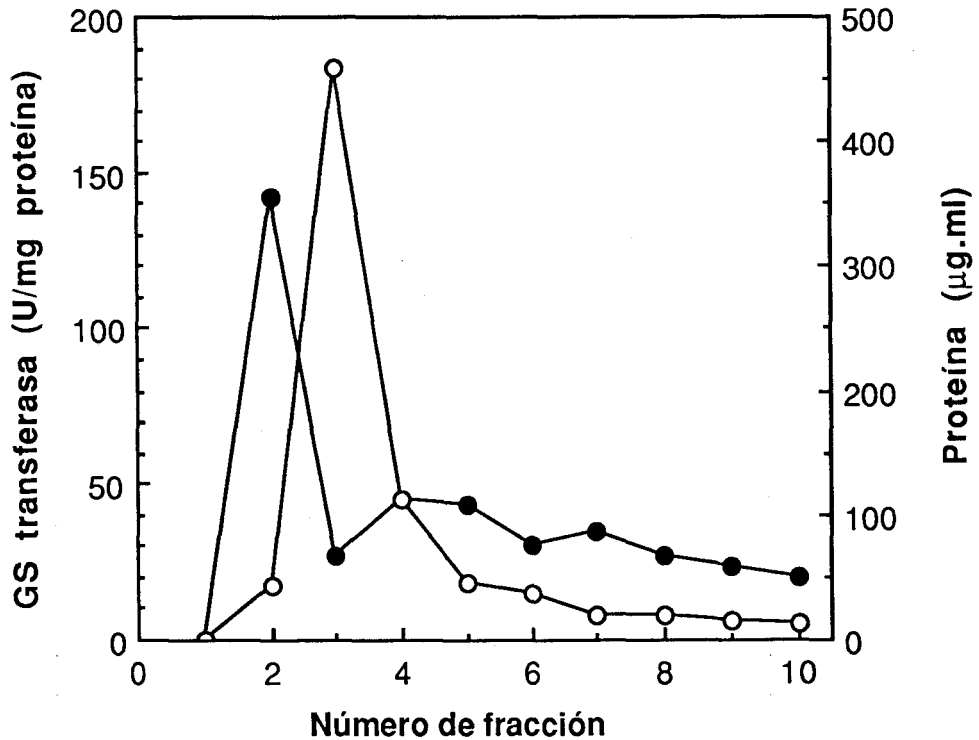


Figura 3.- Perfil de elución de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 de la columna de afinidad de 2', 5'-ADP-sefarosa

Las condiciones de la cromatografía se detallan en el apartado III. A. 1. 2. Se aplicaron 100 U de actividad GS transferasa, procedentes de una cromatografía de intercambio iónico. La figura muestra las fracciones recogidas después de aplicar a la columna tampón A suplementado con KCl 0,4 M y ADP 2 mM.

(— ○ —) proteína; (— ● —) actividad GS transferasa

Tabla 1.- Purificación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803

<u>Fracción</u>	<u>Actividad</u> (U)	<u>Proteína</u> (mg)	<u>Act. especf.</u> (U/mg)	<u>Recuperación</u> (%)	<u>Purificación</u> (veces)
Extracto crudo	120	322	0,37	100	1
Eluato de DEAE-celulosa	100	115	0,87	83	2,3
2',5'-ADP- Sefarosa	76	0,53	143,0	63	253

III. A. 2. CRITERIOS DE HOMOGENEIDAD

III. A. 2. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

III. A. 2. 1. 1. **Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes**

La pureza de la preparación enzimática final se comprobó mediante electroforesis analítica en gel de poliacrilamida, llevada a cabo según se indica en el apartado II. D. 1. 2. 1. La preparación, fracción pico de una cromatografía de afinidad en 2', 5'-ADP-sefarosa, presentó una sola banda de proteína tal como puede observarse en la Figura 5A. Esta misma preparación ha utilizada por parte del grupo del Dr. Diez Dapena de la Universidad de Córdoba en la obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos de conejo contra la GS de *Synechocystis* PCC 6803

III. A. 2. 1. 2 **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes**

Cuando la electroforesis se llevó a cabo en presencia de SDS, se obtuvo nuevamente una sola banda de proteína (Figura 5B). Puede afirmarse, por tanto, que dentro de los valores de resolución del método (2-3 %), la única proteína presente en las preparaciones es glutamina sintetasa.

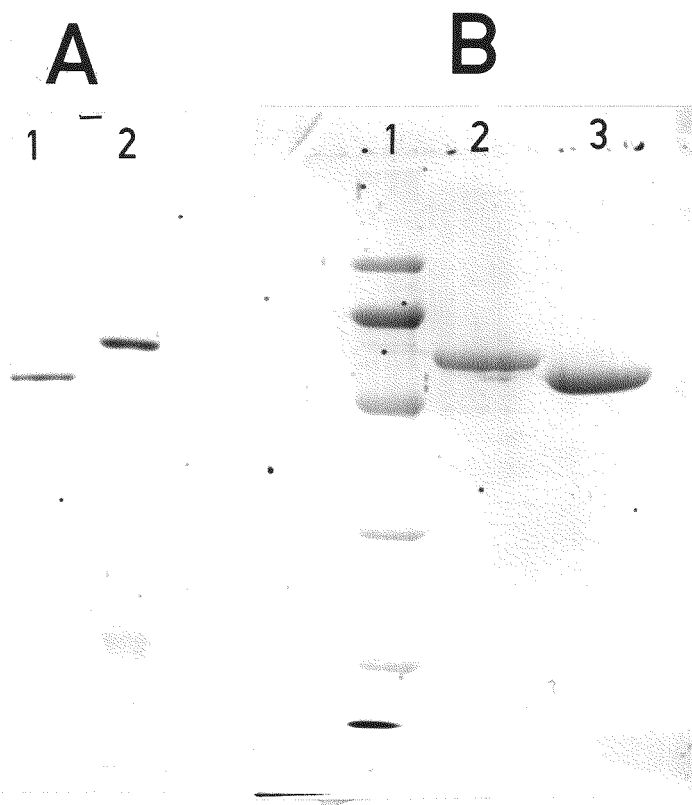


Figura 5.- Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida de la glutamina sintetasa purificada

Las condiciones de las electroforesis se detallan en los apartados II. D. 1. 2. 1. y II. D. 1. 2. 2.

Figura 5A.- Electroforesis en condiciones no desnaturizantes. En el pocillo se aplicó 10 μg de GS purificada. Línea 1, GS de *Synechocystis* ; Línea 2, GS de *Calothrix*

Figura 5B.- Electroforesis en presencia de SDS. Línea 1, marcadores de peso molecular; Línea 2, GS purificada de *Synechocystis* (5 μg); Línea 3; GS purificada de *Calothrix* (7 μg)



III. B. PROPIEDADES DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *Synechocystis* PCC 6803

III. B. 1. PESO MOLECULAR DETERMINADO POR ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Muestras alícuotas de 3-6 μ l de una preparación enzimática purificada, conteniendo 5--10 μ g de proteína, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % de acrilamida conteniendo 0,1 % de SDS. La Figura 5B muestra la presencia de una sola banda en la preparación. Para determinar su peso molecular, se sometieron simultáneamente a electroforesis una serie de proteínas patrones de peso molecular conocido. La Figura 6 muestra el resultado obtenido al representar el logaritmo de los pesos moleculares frente a los valores de R_f de las proteínas marcadoras. El peso molecular, calculado por interpolación a partir de la movilidad relativa de la glutamina sintetasa, fue de 52 kDa, valor similar al descrito para las glutamina sintetetasas de otras cianobacterias: 51 kDa para la de *Synechococcus* PCC 6301 (Florencio y Ramos, 1985), 50 kDa para *Anabena* PCC 7120 (Orr *et al.*, 1981) y 49 kDa para *Calothrix* PCC 7601 (Mérida *et al.*, 1990)

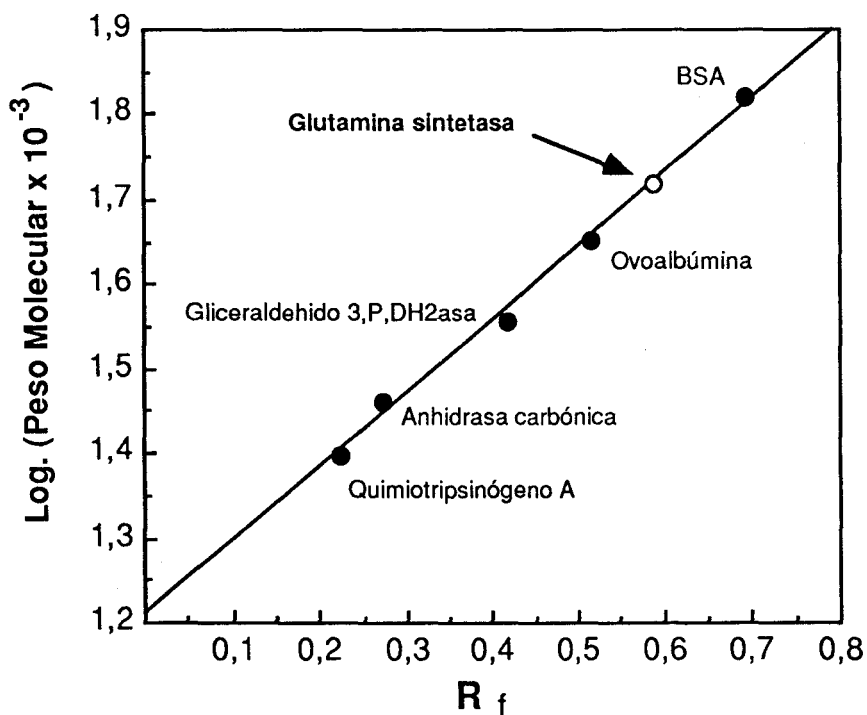


Figura 6.- Determinación del peso molecular de las subunidades de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel al 12 % de acrilamida tal como se describe en el apartado II. D. 1. 2. 1.

III. B. 2. VALORES DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS (K_m) PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA ACTIVIDAD TRANSFERASA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Para estudiar la afinidad de la GS por los diferentes sustratos del ensayo transferasa: glutamina, ADP e hidroxilamina, se ha realizado una serie de representaciones de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3. Quizás el dato más destacado sea la alta afinidad de esta enzima por el ADP, con una K_m en el intervalo de concentración nanomolar. La alta afinidad por este compuesto puede explicar el buen funcionamiento de la cromatografía de afinidad 2', 5'-ADP-Sefarosa en la purificación de la enzima. En las Figuras 7 (ADP), 8 (hidroxilamina) y 9 (glutamina) se muestra las representaciones de dobles recíprocos para los distintos sustratos de la GS en el ensayo transferasa.

III. B. 3. VALORES DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS (K_m) PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA ACTIVIDAD BIOSINTETICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Al igual que para el ensayo transferasa, se ha determinado la afinidad de la GS por sus sustratos fisiológicos (ensayo biosintético), glutamato, ATP y amonio, mediante la representación de Lineweaver-Burk. Los resultados obtenidos se muestran detalladamente en las Figuras 10 (amonio), 11 (ATP) y 12 (glutamato) y se resumen en la Tabla 3. Estos datos son equivalentes a los descritos para otras cianobacterias y bacterias en general; con una alta afinidad para el amonio, 0,17 mM, lo que permite que esta enzima sea la principal vía de asimilación de amonio en condiciones de limitación de amonio en el medio. Las K_m para el ATP y el glutamato están en el intervalo milimolar, 0,55 y 1,2 mM respectivamente.

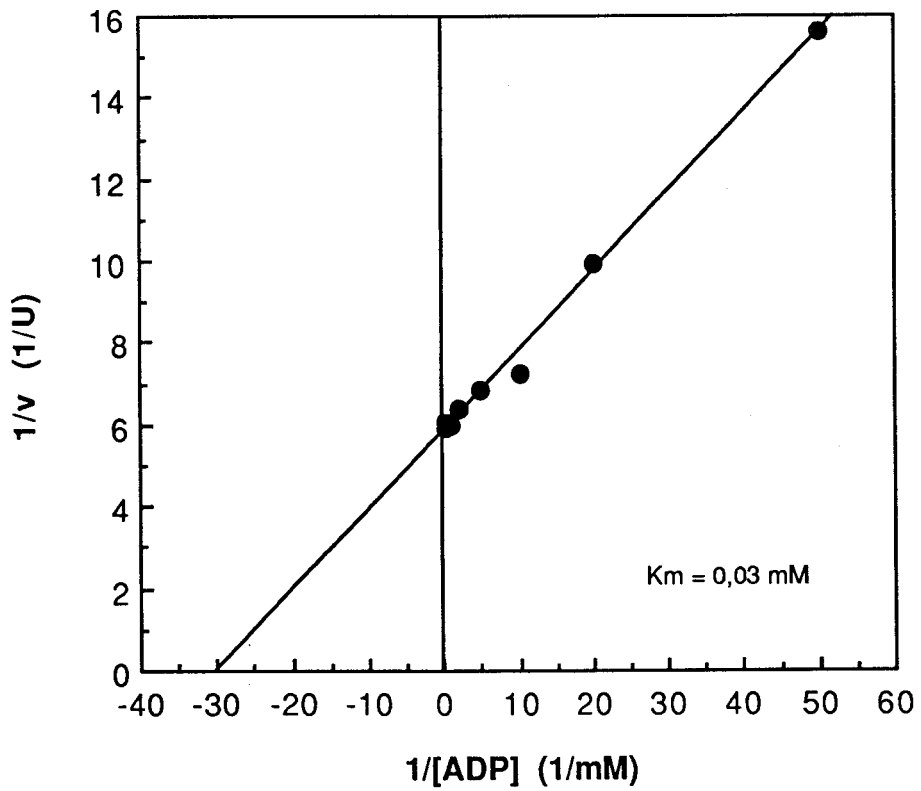


Figura 7.- Km de la glutamina sintetasa para el ADP en el ensayo transferasa

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 1. , excepto que las concentraciones de ADP son las que se indican en la figura.

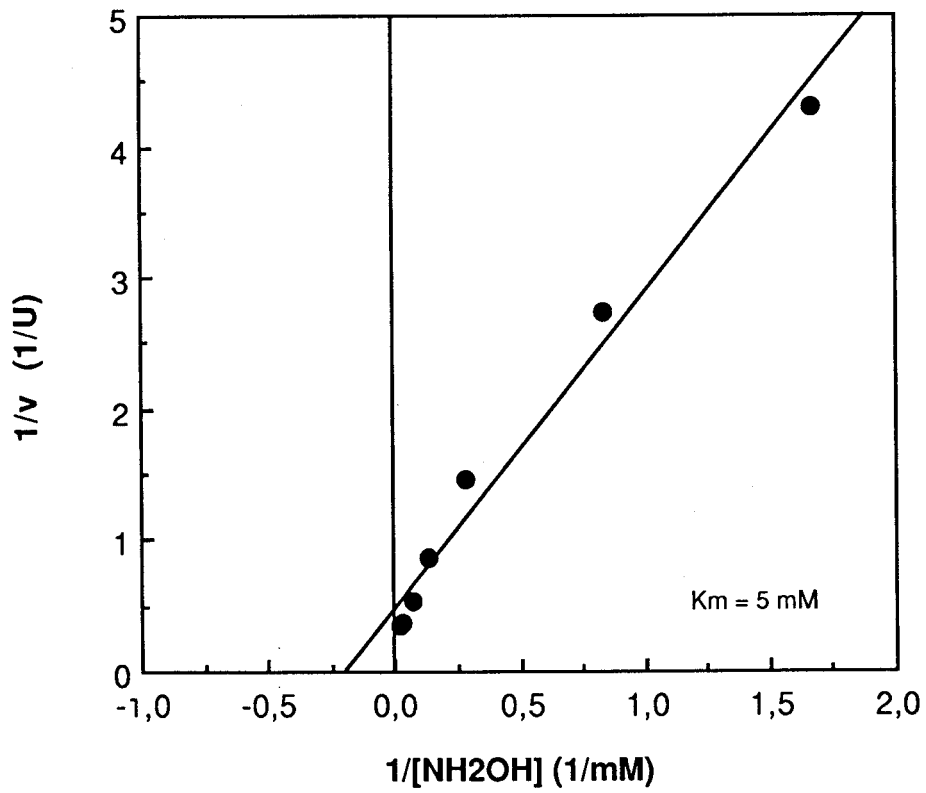


Figura 8.- Km de la glutamina sintetasa por la hidroxilamina en el ensayo transferasa.

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 1., excepto que las concentraciones de hidroxilamina son las que se indican en la figura.

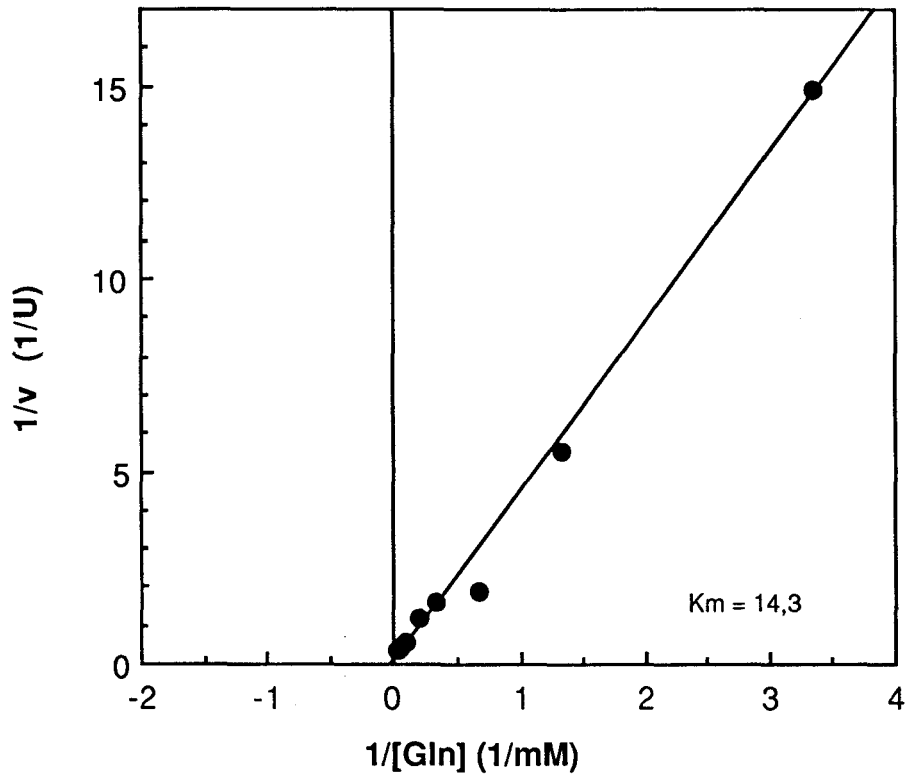


Figura 9.- Km de la glutamina sintetasa por la glutamina en el ensayo transferasa.

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 1. , excepto que las concentraciones de glutamina son las que se indican en la figura.

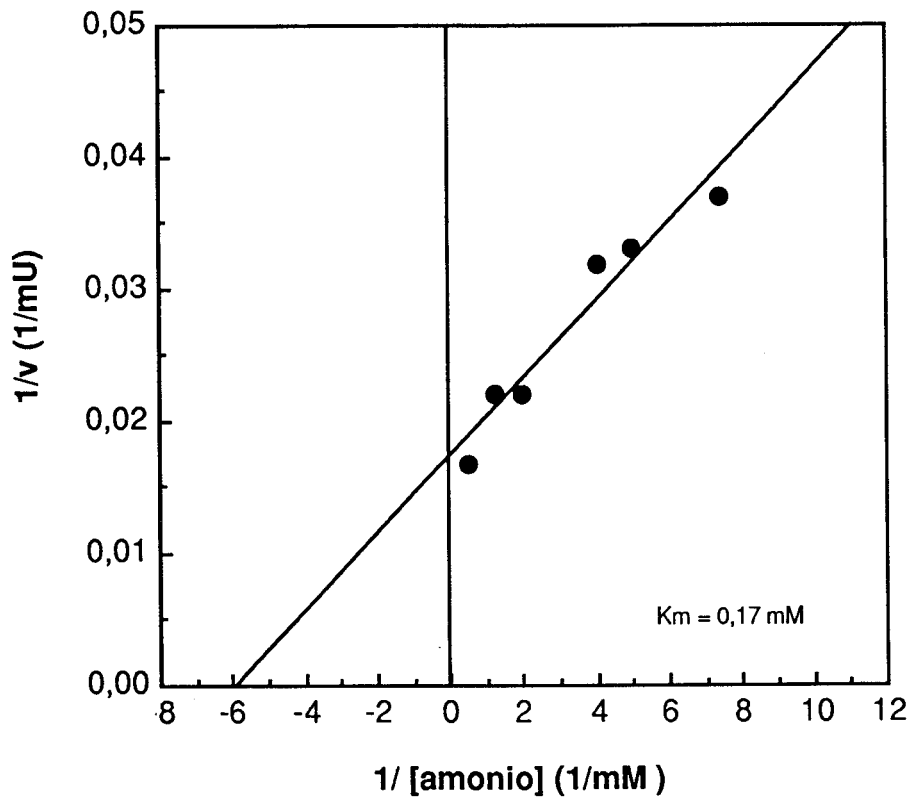


Figura 10.- Km de la glutamina sintetasa por el amonio en el ensayo biosintético.

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 2. , excepto que las concentraciones de amonio son las indicadas en la figura.

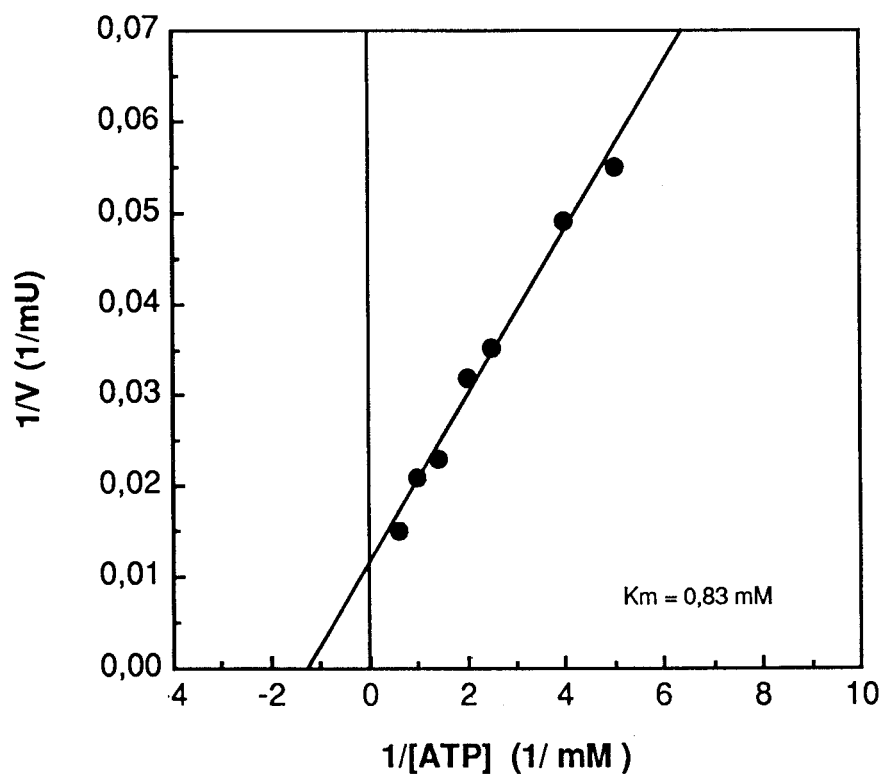


Figura 11.- Km de la glutamina sintetasa por el ATP en el ensayo biosintético.

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 2. , excepto que las concentraciones de ATP son las que se indican en la figura.

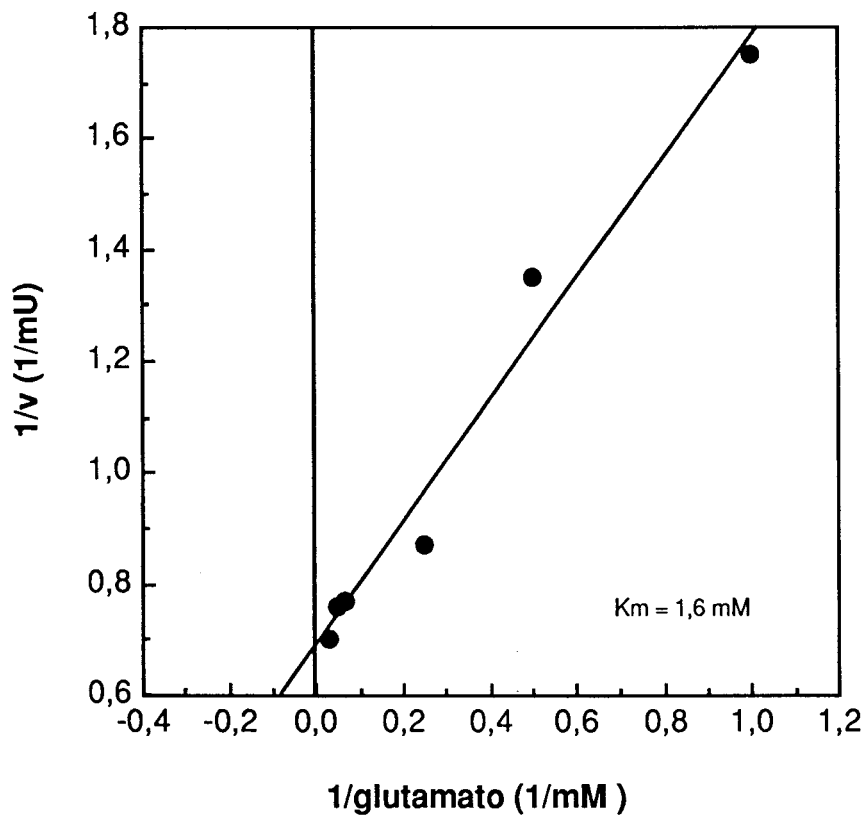


Figura 12.- K_m de la glutamina sintetasa por el glutamato en el ensayo biosintético.

Las condiciones son las descritas en el apartado II. C. 2. 2., excepto que las concentraciones de glutamato son las que se indican en la figura.

Tabla 3.- Parámetros físico-químicos y cinéticos de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803

<u>Parámetro</u>	<u>Valor</u>
Masa molecular de la subunidad	52
Tipos de monómero	1
Temperatura óptima (°C)	
Ensayo transferasa	34
Ensayo biosintético	35
pH óptimo	
Ensayo transferasa	6,5
Ensayo biosintético	7,2
Km aparente (mM)	
Ensayo transferasa	
- ADP	0,03
- Hidroxilamina	5,0
- Glutamina	14,3
Ensayo biosintético	
- Amonio	0,17
- ATP	0,82
- Glutamato	1,60

El peso molecular de la subunidad se calculó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, tal como se detalla en el apartado III. B. 1. Las condiciones de ensayo son las estándar (apartado II. C. 2.), excepto que el sustrato cuya Km se estudia se añade a distintas concentraciones no saturantes. Los datos de velocidad inicial obtenidos se representan en función de la concentración de sustrato utilizada en cada ensayo ($1/v$ frente a $1/[S]$). El tiempo de ensayo fue de 5 min para el ensayo de la actividad transferasa y 15 para la biosintética.

III. B. 4 EFEECTO DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Tanto la actividad transferasa como la biosintética son dependientes de cationes divalentes, habiendo sido propuesto que la disponibilidad de cationes en el interior de la célula podría ser una de los principales sistema de regulación de la glutamina sintetasa de cianobacteria (Stacey *et al.* , 1979; Ip *et al.* , 1983).

Hemos determinado el efecto de cationes sobre la actividad biosintética de la GS de *Synechocystis* PCC 6803. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al ensayar la actividad enzimática de una preparación de GS purificada empleando como catión divalente el Mg^{2+} (control), Mn^{2+} , Co^{2+} ó Ca^{2+} . Se puede observar que la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* es fuertemente dependiente de Mg^{2+} , y su sustitución por otro catión conlleva una considerable pérdida de actividad: 85,4 %, 99 % y 65 % para el Mn^{2+} , Ca^{2+} y Co^{2+} respectivamente.

III. B. 5. EFFECTOS DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES TRANSFERASAS Y BIOSINTÉTICAS DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Se ha estudiado el efecto de algunos compuestos, tales como aminoácidos y nucleótidos, descritos como inhibidores alostéricos de la GS de otras cianobacterias, sobre las actividades biosintética y transferasa de la GS de *Synechocystis* PCC 6803.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos al ensayar la actividad enzimática de preparaciones de GS pura en presencia de 1 mM de distintos

Tabla 4.- Efecto de cationes divalentes sobre la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803.

<u>Cation</u>	<u>Actividad GS</u> <u>(mU/mg proteína)</u>	<u>% actividad</u>
Mg ²⁺	143	100
Mn ²⁺	21,0	14,6
Ca ²⁺	9,6	0,7
Co ²⁺	49,7	35

Las condiciones de ensayo de la actividad biosintética fueron las descritas en el apartado II. C. 2. 2., salvo que el catión divalente en cada caso fue el indicado en la tabla. La concentración de catión fue de 25 mM en todos los casos.

compuestos. La actividad transferasa se vió fuertemente inhibida por alanina, glicina y serina (94, 75 y 62 % de inhibición). Sin embargo, estos aminoácidos ejercieron poco o ningún efecto sobre la actividad biosintética; así, la alanina inhibió en un 52 % la actividad biosintética mientras que la glicina y la serina lo hicieron en un 5 y 13 % respectivamente. Tal como aparece en la Tabla 4 los principales inhibidores de la actividad biosintética fueron los nucleótidos ADP y AMP, con un 77 y 67 % de inhibición respectivamente.

III. B. 6. INHIBICION POR ADP DE LA ACTIVIDAD BIOSINTETICA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

El ADP junto con el AMP parecen ser los inhibidores más potentes de la actividad biosintética de la GS. Debido a que el ADP es uno de los productos de la actividad enzimática de la glutamina sintetasa, hemos realizado un estudio más detallado de su inhibición, en concreto estudiando qué tipo de inhibición presenta respecto a dos de los sustratos de la GS, el glutamato y el ATP.

Respecto al glutamato, se ha determinado el grado de inhibición producido por distintas concentraciones de ADP en el ensayo, usando tres concentraciones distintas de glutamato. Los resultados obtenidos se han analizado usando

Tabla 5.- Efecto de amino ácidos y otros compuestos en las actividades biosintética y transferasa de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803

<u>Adición</u>	<u>Actividad transferasa</u>	<u>Actividad biosintética</u>
Ninguna	100	100
Alanina	6	48
Aspártico	102	59
Asparagina	105	100
Glicina	25	95
Arginina	70	80
Serina	38	87
Glucosamina 6-fosfato	106	100
AMP	117	33
ADP	nd ¹	23

¹nd, no determinado

Una alícuota de 10 µg de glutamina sintetasa pura se ensayó en presencia de 1 mM de diversos compuestos en el caso del ensayo biosintético y 10 mM en el caso del ensayo transferasa. Las condiciones del ensayo transferasa y biosintético fueron las descritas en los apartados II. C. 2. 1. y II. C. 2. 2. respectivamente. El 100 % de actividad corresponde a 1,4 (biosintética) y 57,5 (transferasa) U /mg proteína.

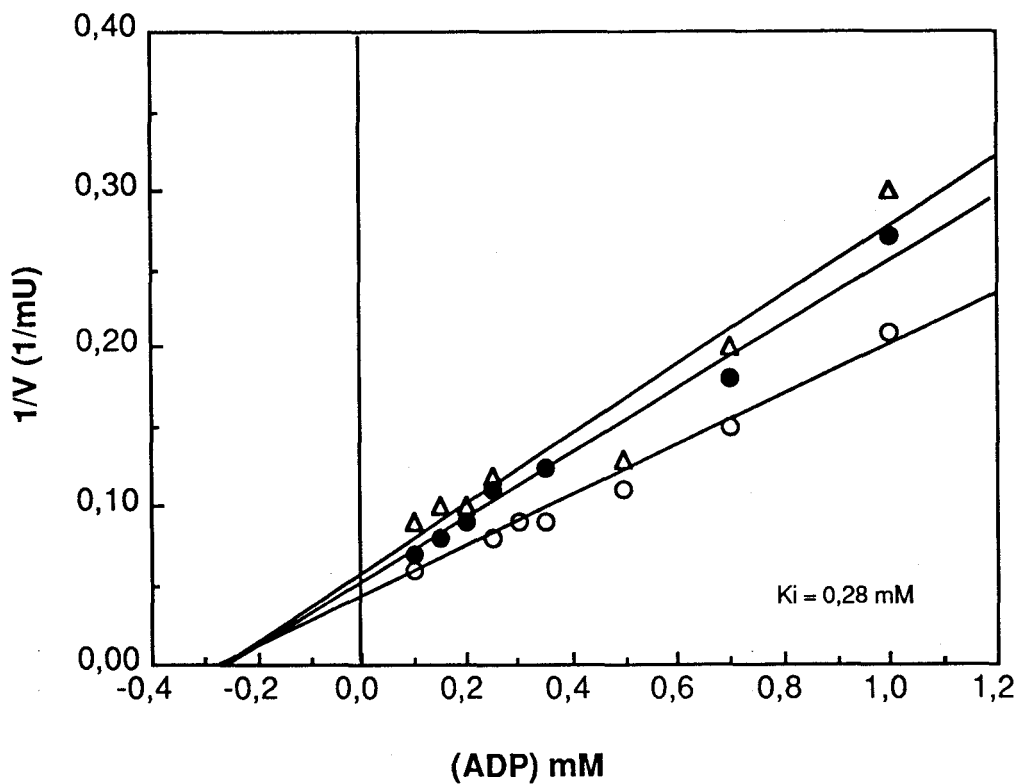


Figura 13.- Inhibición por ADP de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 . Efecto de la variación de la concentración de glutamato.

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado II. C. 2. 2., salvo que las concentraciones de glutamato fueron 2 mM (Δ) 10 mM (\circ) y 25 mM (\bullet). En cada ensayo se emplearon 10 μ g de glutamina sintetasa pura. El método gráfico de análisis empleado fue la representación de Dixon.

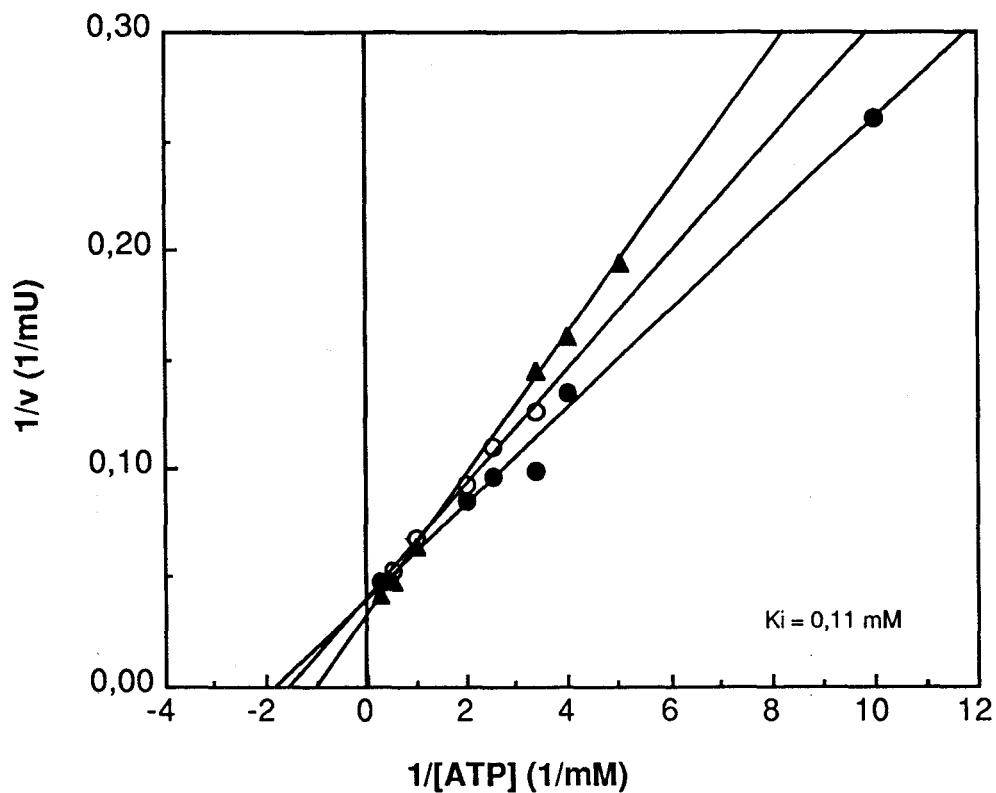


Figura 14.- Inhibición por ADP de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803. Efecto de la variación de la concentración de ATP.

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado II. C. 2. 2., salvo que las concentraciones de ATP fueron las indicadas en la figura. Las concentraciones de ADP empleadas fueron : sin ADP (●) 10 μ M (○) y 50 μ M (▲) En cada ensayo se emplearon 10 μ g de enzima pura. El análisis de los resultados se realizó mediante la representación de Lineweaver-Burk .

la representación de Dixon. En la Figura 13 se puede observar que la inhibición por ADP es no competitiva respecto al glutamato. Con una K_i de 0,28 mM. La menor actividad obtenida con 25 mM de glutamato en comparación con la detectada con 10 mM podría indicar una posible inhibición por sustrato de la actividad biosintética de la GS.

En el caso del ATP se empleó la representación de Lineweaver-Burk. Se utilizaron tres concentraciones distintas de inhibidor, y en cada una de ellas se estudió cómo aumentaba la velocidad de la reacción enzimática al aumentar la concentración del sustrato estudiado, en este caso el ATP. En la Figura 14 se observa que la inhibición por ADP es competitiva respecto al ATP ya que el aumento de la concentración del inhibidor determina una disminución de la afinidad del enzima por su sustrato, permaneciendo invariable la velocidad máxima alcanzada. La K_i calculada de esta inhibición fue de 0,11 mM.

III. B. 7. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE SYNECHOCYSTIS PCC 6803

A partir de fracciones puras de glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 se han obtenido anticuerpos de conejo policlonales y monoespecíficos contra dicha enzima. Nuestro grupo dispone, además, de anticuerpos monoespecíficos obtenidos contra la glutamina sintetasa de *Synechococcus* PCC 6301 y *Calothrix* PCC 7601. Esto nos ha permitido realizar un estudio inmunológico de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803, con objeto de establecer las relaciones filogenéticas entre las enzimas d estas tres cianobacterias.

El estudio se ha realizado mediante inmunotitulación de la glutamina sintetasas de *Synechocystis* y *Calothrix* con los anticuerpos obtenidos contra las

enzimas de *Synechococcus* y *Synechocystis* . Alícuotas de 0,3 ml de preparaciones de enzima pura, conteniendo 12 μg en la titulación con el anticuerpo de *Synechocystis* , ó 30 μg de enzima en la titulación con el anticuerpo de *Synechococcus* , se incubaron, tal como se describe en el apartado II. D. 1. 3., con cantidades crecientes de anticuerpo.. Es interesante destacar que, a diferencia de lo que ocurre con otros complejos anticuerpo-enzima, el complejo glutamina sintetasa-anticuerpo mantiene su actividad, por lo que es necesario centrifugar las muestras (10.000 x *g* a 4 °C durante 15 min) con objeto de determinar la proporción de enzima que permanece libre.

En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados conseguidos con los anticuerpos obtenidos contra las glutamina sintetasa de las dos cianobacterias, la de *Synechocystis* (Figura 15) y la de *Synechococcus* (Figura 16). Se observa que los dos anticuerpos reconocen a la enzima de *Calothrix* , cianobacteria filamentosa. Sin embargo, a partir de estos resultados no puede establecerse cual de las dos GS de las cianobacterias unicelulares estudiadas presenta mayor identidad con la enzima de *Calothrix* .

El estudio de las relaciones de identidad entre la GS de estas tres cianobacterias se ha llevado a cabo empleando técnicas de inmunodifusión pasiva en gel de agarosa (Ouchterlony) tal como se describe en el apartado II. D. 1. 4. En la Figura 17A. se muestra un Ouchterlony del anticuerpo obtenido contra la GS de *Synechocystis* frente a las GS puras de las tres cianobacterias. En el pocillo central se colocaron 84 μg de anti-GS y en los pocillos externos 10 μg de GS purificada de *Synechocystis* , *Synechococcus* y *Calothrix* . A partir de las bandas de inmunoprecipitación puede deducirse que, como cabría esperar, la GS de *Synechocystis* presenta mayor identidad con la de *Synechococcus* que con la de

Calothrix . La misma información se deduce de la Figura 17B, que corresponde a un Ouchterlony en cuyo pocillo central se ha colocado 50 μg de anti-GS de *Synechococcus* . La información sobre cuál de las dos enzimas de cianobacterias unicelulares presenta mayor identidad con la de la filamentosa nos la proporciona la Figura 17C, donde se muestra un ouchterlony realizado empleando anti-GS de *Calothrix* (210 μg en el pocillo central). En esta figura se puede observar que la GS de *Synechocystis* presenta epitopos reconocidos por el anticuerpo contra la enzima de *Calothrix* que están ausentes en la GS de *Synechococcus* , mientras que todos los epitopos reconocidos por el anticuerpo en la GS de *Synechococcus* están presentes también en la enzima de *Synechocystis* . Puede afirmarse por tanto, que la GS de *Synechocystis* presenta mayor identidad con la GS de *Calothrix* que la enzima de *Synechococcus*. Estos datos concuerdan con los estudios realizados comparando secuencias de ARN ribosómico 16S, los cuales sitúan a *Synechocystis* como precursor de las cianobacterias filamentosas (Bonen *et al.* , 1979).

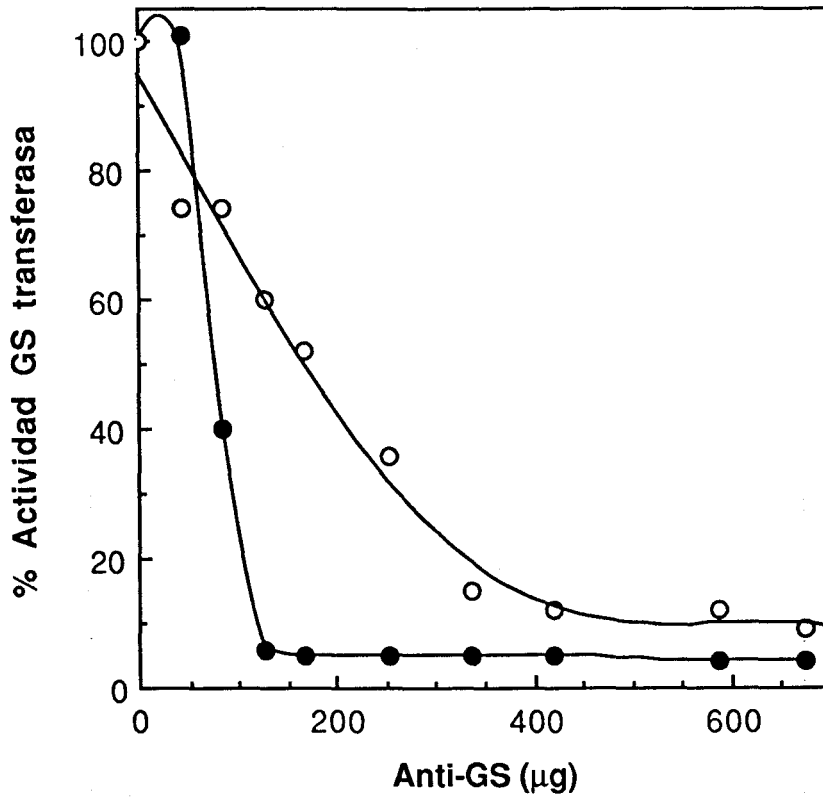


Figura 15.- Inmunotitulación de las glutamina sintetetas purificadas de *Synechocystis* y *Calothrix* con anti-GS de *Synechocystis*.

Alicuotas de 12 µg de GS pura se incubaron en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos mono-específicos anti-GS de *Synechocystis*, siguiendo el método descrito en el apartado II. D. 1. 3. La actividad GS transferasa se determinó en el sobrenadante resultante de la centrifugación de las muestras a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El 100 % de actividad GS corresponde a 2 U / ml (*Synechocystis*) y 3 U / ml (*Calothrix*).

(— ● —) GS de *Synechocystis*; (— ○ —) GS de *Calothrix*.

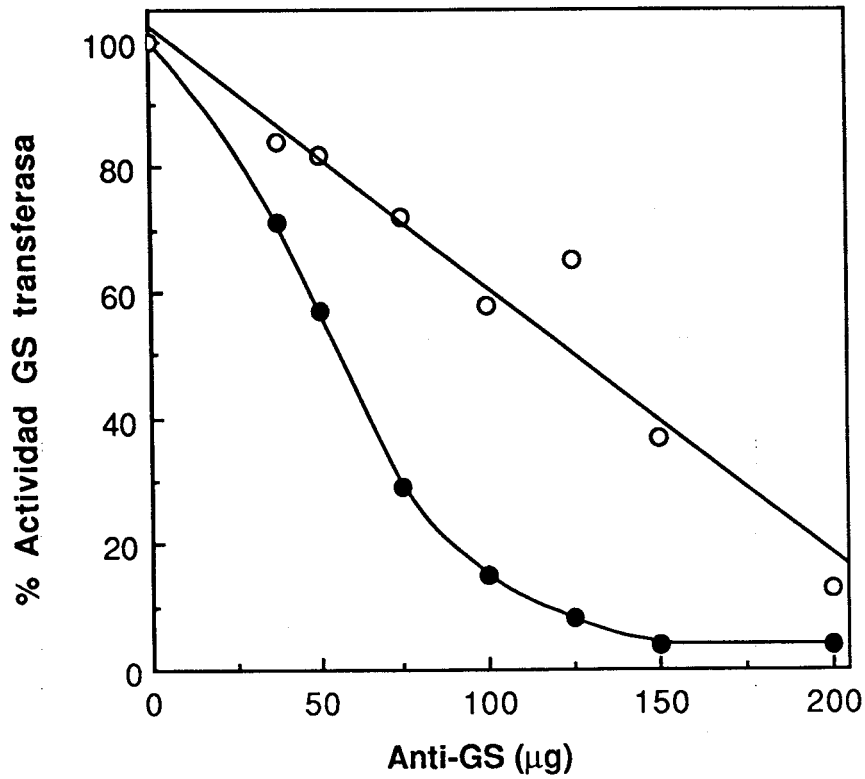
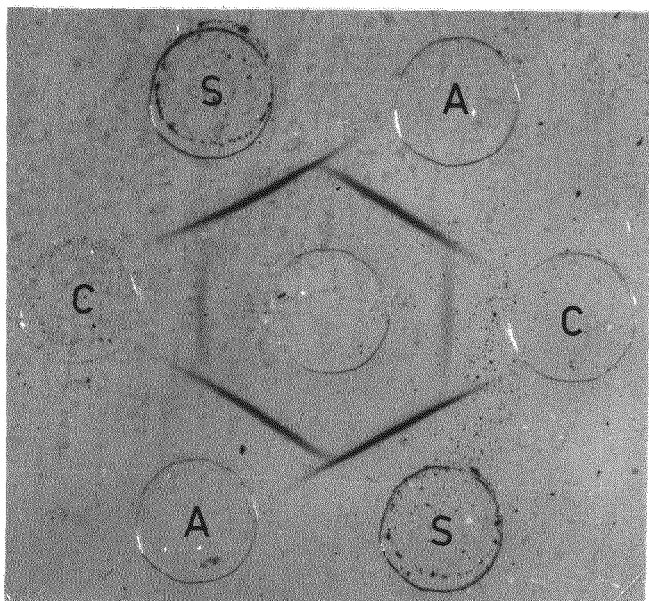


Figura 16 .- Inmunotitulación de las glutamina sintetasas purificadas de *Synechocystis* y *Calothrix* con anti-GS de *Synechococcus*.

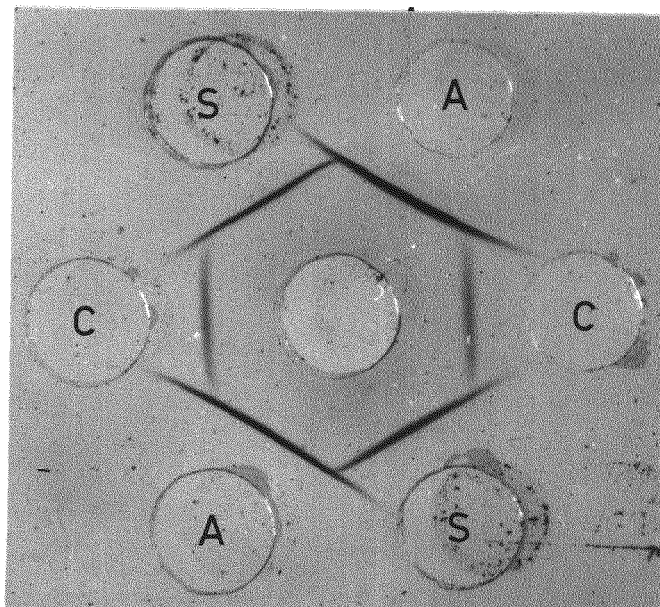
Alicuotas de 30 µg de GS pura se incubaron en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos monoespecíficos anti-GS de *Synechococcus*, siguiendo el método descrito en el apartado II. D. 1. 3. La actividad GS transferasa se determinó en el sobrenadante resultante de la centrifugación de las muestras a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El 100 % de actividad GS corresponde a 5,7 U / ml (*Synechocystis*) y 6 U / ml (*Calothrix*).

(— ● —) GS de *Synechocystis*; (— ○ —) GS de *Calothrix*.

A



B



C

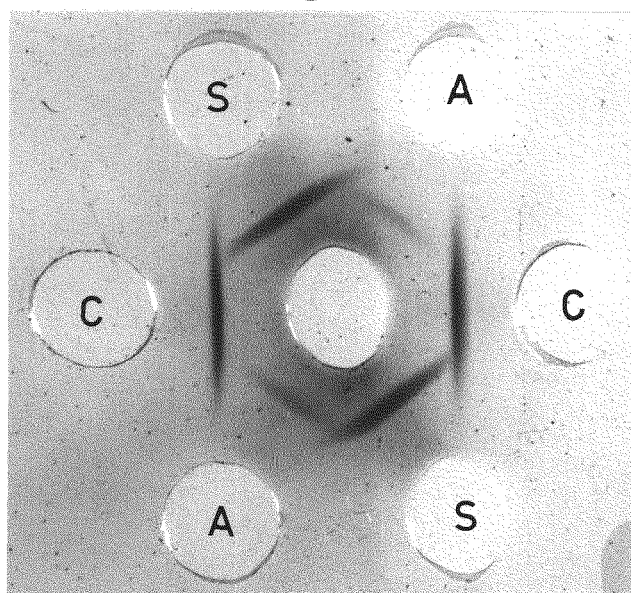


Figura 17.- Doble difusión en gel de agarosa.

En el pocillo central se colocó 84 μg de anticuerpo anti-GS de *Synechocystis* (Figura 17A), 50 μg de anti-GS de *Synechococcus* (Figura 17B) y 210 μg de anti-GS de *Calothrix* (Figura 17C). En los pocillos externos se colocó 10 μg (Figuras 17A y B) o 20 μg (Figura 17C) de GS purificada de las tres cianobacterias .

S (*Synechocystis*); A (*Synechococcus*); C (*Calothrix*)



III. C. REGULACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA: EFFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO

III. C. 1. NIVELES DE ACTIVIDAD Y PROTEINA GLUTAMINA SINTETASA EN CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO O AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

Hemos determinado los niveles de proteína y actividad de la glutamina sintetasa en células cultivadas en medios con nitrato o amonio como fuente de nitrógeno. La determinación de los niveles de proteína glutamina sintetasa se ha realizado mediante inmunolectroforesis cuantitativa, tal como se describe en el apartado II. D. 1. 2. 3., cuantificando el área de inmunoprecipitación de cada muestra y comparándolo con las producidas por muestras de glutamina sintetasa pura de concentración conocida. La recta de calibrado obtenida con estas fracciones de glutamina sintetasa pura presentaba un r^2 del 99 %. Tal como se muestra en la Tabla 6 las células cultivadas en amonio como fuente de nitrógeno presentaban aproximadamente la mitad de proteína glutamina sintetasa que aquellas cultivadas empleando nitrato como fuente de nitrógeno.

En estas células se han determinado también los niveles de actividad transferasa de la glutamina sintetasa. Tal como se puede observar en la Tabla 5, los niveles de actividad en células cultivadas con amonio fueron sólo un 20 % de la detectada en células cultivadas en nitrato como fuente de nitrógeno.

Estos resultados indican la presencia en *Synechocystis* de una inhibición de la síntesis de glutamina sintetasa mediada por amonio, de forma que en condiciones en las que la fuente de nitrógeno disponible es amonio la cantidad de enzima es aproximadamente la mitad de la que presentan las células cuando la

fuerza de nitrógeno es nitrato. Asimismo, los datos de actividad glutamina sintetasa en ambas condiciones de cultivo indican la existencia de una inactivación de la glutamina sintetasa mediada por amonio, ya que los niveles de actividad no corresponden con los de proteína glutamina sintetasa determinados, 19 y 50 % respectivamente (porcentajes expresados respecto a los valores determinados en células cultivadas en nitrato como fuente de nitrógeno).

III. C. 2. EFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO

Se ha seguido la variación de la actividad glutamina sintetasa tras añadir amonio a células de *Synechocystis* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno. Tal como se observa en la Figura 18, la adición de 0,25 mM de amonio provocó una rápida disminución de la actividad glutamina sintetasa, mostrando 25 min después de la adición sólo un 10 % de la actividad original. Como se puede comprobar en las figuras 18 A y B, una vez agotado el amonio del medio, la actividad glutamina sintetasa se restableció, alcanzando en menos de 30 min los niveles previos a la adición de amonio.

La pérdida de actividad glutamina sintetasa provocada por la adición de amonio se observó empleando tanto el ensayo transferasa como el biosintético, lo cual apoya el significado fisiológico de este efecto. El paralelismo obtenido empleando ambos ensayos nos permite utilizar el ensayo transferasa, de más fácil realización que el biosintético en estudios posteriores.

Tabla 6.- Niveles de actividad transferasa y proteína glutamina sintetasa en células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato o amonio como fuente de nitrógeno.

<u>FUENTE DE NITROGENO</u>	<u>Actividad GS (mU/mg prot.) (%)</u>	<u>Proteína GS (µg GS/mg prot.) (%)</u>
NITRATO	554 (100)	3,9 (100)
AMONIO	107 (19)	2,0 (51)

Se ha determinado la actividad y los niveles de proteína GS en células de *Synechocystis* cultivadas en NaNO_3 (20 mM) ó NH_4Cl (15 mM) como fuente de nitrógeno.

La determinación de la actividad GS transferasa se realizó según se detalla en el apartado II. C. 2. 1. La determinación de los niveles de proteína GS se llevó a cabo mediante inmunoelectroforesis cuantitativa, tal como se describe en el apartado II. D. 1. 2. 3.

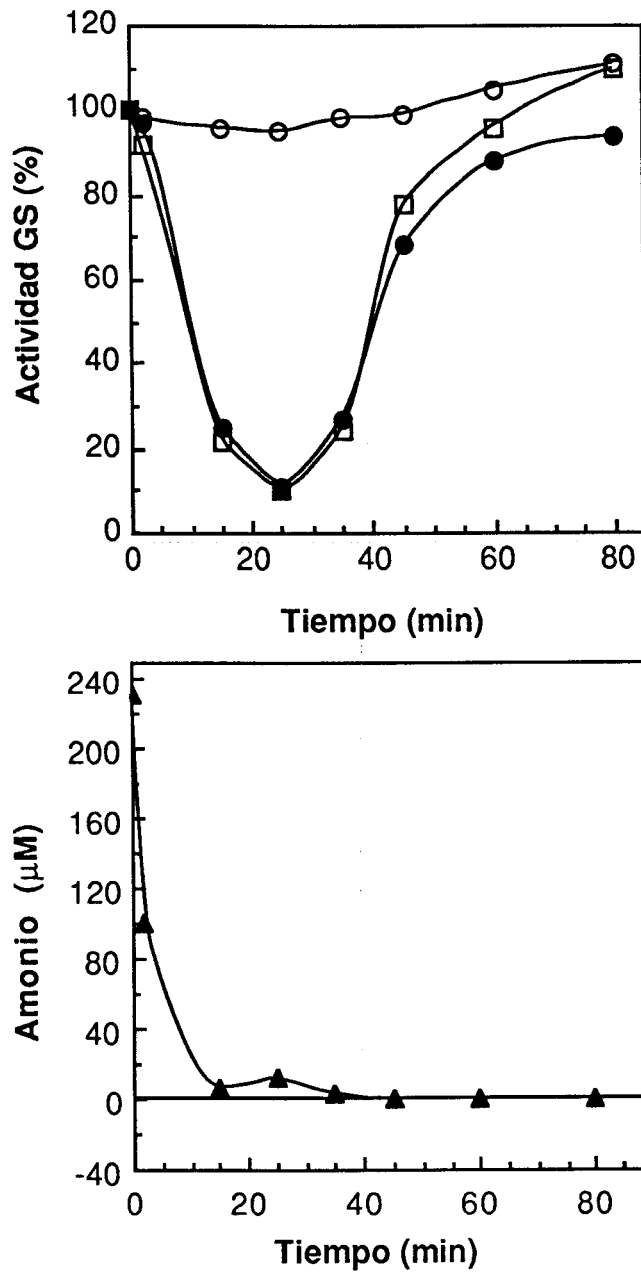


Figura 18.- Efecto del amonio sobre la actividad glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803

Las células se cultivaron con nitrato (8mM) como fuente de nitrógeno. A tiempo 0 se le añadió al cultivo NH₄Cl (0,25 mM, concentración final). Las actividades transferasa y biosintética se determinaron tal como se describe en los apartados II. C. 1. 1. y II. C. 1. 2. respectivamente. La concentración de amonio en el medio se determinó según se describe en el apartado II. E. 7.. El 100 % de actividad corresponde a 0,96 y 0,027 U . mg/proteína para la actividad transferasa y biosintética respectivamente.(□) + NH₄Cl, ensayo transferasa; (○)sin adición, ensayo transferasa; (●) + NH₄Cl, ensayo biosintético.

III. C. 3. EFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LOS NIVELES DE PROTEINA GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO

La pérdida de actividad observada al añadir amonio a células cultivadas en nitrato podría ser debida tanto a una inactivación de la enzima como a una represión de su síntesis y posterior degradación de la existente hasta alcanzar los niveles detectados. La rapidez del proceso parece apoyar la existencia de una inactivación de la enzima aunque no descarta la segunda hipótesis. Con objeto de identificar la causa de la pérdida de actividad glutamina sintetasa observada a corto plazo tras la adición de amonio, se han determinado mediante inmunolectroforesis cuantitativa los niveles de proteína glutamina sintetasa antes y una hora después de la adición de amonio a células de *Synechocystis* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno. Como se observa en la Tabla 7, mientras que la actividad glutamina sintetasa después de una hora de la adición de amonio era sólo de un 9 % de la actividad presente antes de la adición, los niveles de proteína glutamina sintetasa se mantuvieron constantes en ambas condiciones. Estos resultados indican que la pérdida de actividad detectada se debe a una inactivación de la glutamina sintetasa provocada por la adición de amonio al medio de cultivo y no a una disminución del número de moléculas GS.

III. C. 4. EFECTO DE LA ADICION DE AMONIO SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO

Con objeto de determinar las alteraciones metabólicas producidas por la adición de amonio, se han seguido los cambios de los niveles intracelulares de diversos aminoácidos tras la adición de amonio a células cultivadas en nitrato. Tal

como se muestra en la Figura 19, la adición de amonio provocó una rápida alteración en los niveles intracelulares de los aminoácidos directamente relacionados con la ruta enzimática glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). Así, en un tiempo inferior a los 30 s después de la adición de amonio, el nivel de glutamato disminuyó aproximadamente siete veces su valor, de 57 a 8 nmol/mg proteína, mientras que, en el mismo intervalo de tiempo, la glutamina aumentó su nivel en la misma magnitud, de 7 a 56 nmol/mg proteína. La alteración en los niveles intracelulares de estos aminoácidos fue transitoria, observándose a continuación un descenso en el nivel de glutamina y un aumento paralelo del nivel de glutamato hasta alcanzar unos valores cercanos a los presentes antes de la adición de amonio al cultivo, tal como se puede observar en la Figura 20A. En esta última gráfica junto con la Figura 20B, se observa que el descenso del nivel de glutamina tuvo lugar de una forma paralela a la disminución de la actividad glutamina sintetasa del cultivo.

Estos resultados parecen indicar que la adición de amonio a células cultivadas en nitrato permite que, gracias a la actividad glutamina sintetasa, la mayor parte del glutamato de la célula pase a glutamina. La posterior inactivación de la glutamina sintetasa permitiría el restablecimiento de los niveles intracelulares de estos aminoácidos hasta unos valores cercanos a los originales.

Del resto de los aminoácidos estudiados, sólo el aspartato mostró una alteración significativa en función de la fuente de nitrógeno suministrada. Como se observa en la Figura 19, el nivel de aspartato aumentó unas dos veces su valor 15 min después de la adición de amonio al cultivo, disminuyendo a continuación.

Tabla 7.- Efecto de la adición de amonio sobre la glutamina sintetasa de células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato.

<u>ADICION</u>	<u>Actividad GS (mU/mg prot.) (%)</u>	<u>Proteína GS (µg GS/mg prot.) (%)</u>
NINGUNA	813 (100)	3,9 (100)
NH ₄ Cl, 2 mM	74 (9)	3,7 (95)

A células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato como fuente de nitrógeno se les añadió 2 mM de NH₄Cl (concentración final) y se determinaron la actividad y los niveles de proteína GS en las células antes y una hora después de la adición de amonio al cultivo.

La determinación de la actividad GS transferasa se realizó según se detalla en el apartado II. C. 2. 1. La determinación de los niveles de proteína GS se llevó a cabo mediante inmunoelectroforesis cuantitativa, tal como se describe en el apartado II. D. 1. 2. 3.

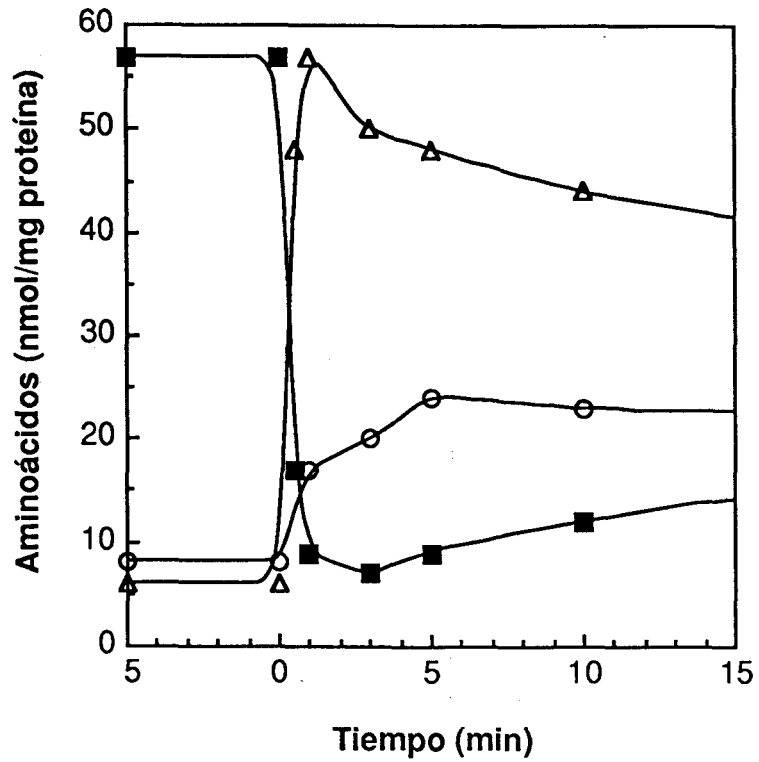


Figura 19.- Efecto de la adición de amonio sobre el nivel intracelular de algunos aminoácidos en células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato

A células cultivadas en nitrato se le añadió NH_4Cl (2 mM, concentración final) a tiempo 0 . Los niveles de glutamato ; glutamina y aspartato , se determinaron como se describe en el apartado II. E. 2.

(— ■ —) glutamato; (— Δ —) glutamina; (— ○ —) aspartato

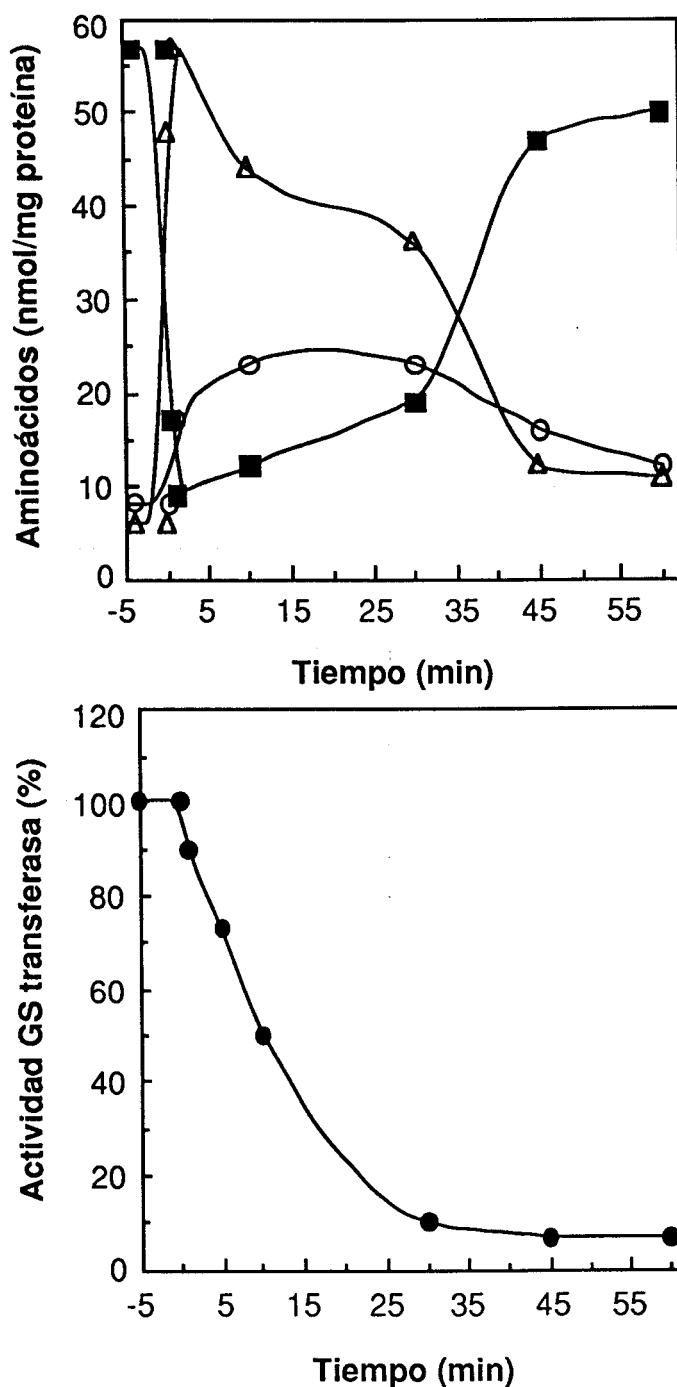


Figura 20.- Efecto de la adición de amonio sobre los niveles intracelulares de algunos aminoácidos en células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato

A células cultivadas en nitrato se le añadió NH_4Cl (2 mM, concentración final) a tiempo 0. Los niveles de glutamato; glutamina y aspartato, se determinaron como se describe en el apartado II. E. 2. La actividad GS transferasa se ensayo como se describe en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 0,98 U / mg proteína. Glutamato (■), glutamina (Δ), aspartato (■).

III. C. 5. EFEECTO DE LA AZASERINA SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Se ha llevado a cabo una serie de estudios con inhibidores metabólicos con objeto de determinar, en primer lugar, si la inactivación de la glutamina sintetasa se debe a un efecto directo del amonio sobre la enzima o si se requiere su metabolización y, en este último caso, determinar qué señales metabólicas son las encargadas de modular la actividad glutamina sintetasa.

Uno de los inhibidores empleados es la azaserina, un inhibidor de la glutamato sintasa (GOGAT) y transamidases en general (Pinkus, 1977). La adición de 0,1 mM de azaserina a células de *Synechocystis* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, una hora después de haber añadido amonio a dicho cultivo, provocó una reactivación de la glutamina sintetasa, alcanzando ésta entre un 70 y un 80 % de la actividad presente en el cultivo antes de la adición de amonio (Figura 21).

La Figura 22 muestra que la adición de azaserina no inhibió la entrada de amonio al interior de la célula, detectándose consumo del ión después de dicha adición. Como se observa en la gráfica, unos 20 min después de la adición de azaserina se detectó un aumento de la concentración de amonio en el cultivo, debido a la entrada y posterior reducción hasta amonio del nitrato del medio. La entrada de nitrato al interior celular se inhibe por amonio, pero dicha inhibición se ve suprimida por la acción de la azaserina (Flores et al., 1980).

Estos resultados indican que la inactivación de la glutamina sintetasa no se debe a una acción directa del amonio sobre la enzima, requiriéndose su metabolización. La reactivación obtenida por azaserina parece indicar la necesidad

de la metabolización de la glutamina a través de la enzima glutamato sintasa para la inactivación de la glutamina sintetasa.

III. C. 6. EFFECTO DE LA 6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINA SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Con objeto de comprobar si la reactivación de la glutamina sintetasa provocada por la azaserina se debe a la inhibición de la GOGAT, hemos usado otro inhibidor de dicha enzima, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) (Pinkus et al., 1977). En la Figura 23 se observa que la adición de 0,1 mM de DON a células cuya glutamina sintetasa está inactivada por adición de amonio al medio de cultivo, provocó, al igual que la azaserina, una reactivación de la glutamina sintetasa hasta alcanzar un valor del 90 % del existente antes de la adición de amonio. Este resultado parece confirmar que, efectivamente, el bloqueo de la actividad glutamato sintasa en células tratadas con amonio provoca la reactivación de la glutamina sintetasa.

III. C. 8. EFFECTO DE LA AZASERINA SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO Y TRATADAS CON AMONIO.

Tanto en el estudio con azaserina como en el realizado con el DON no se ha medido la actividad de la glutamato sintasa, si bien estas concentraciones son suficientes para inhibirlas (Silvia Marqués, Tesis Doctoral). En su lugar se han determinado los niveles intracelulares de los aminoácidos relacionados con la ruta

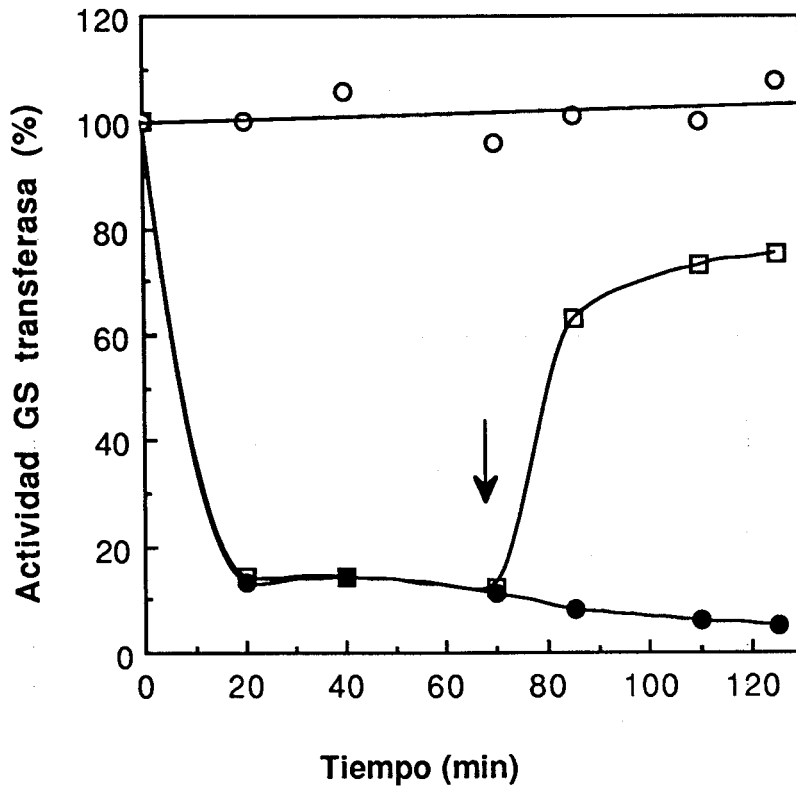


Figura 21.- Efecto de la azaserina sobre la actividad glutamina sintetasa en células de *Synechocystis* PCC 6803 tratadas con amonio

A células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato se le añadió, a tiempo 0, 2 mM de NH₄Cl (concentración final). La flecha indica la adición de 0,1 mM de azaserina a uno de los cultivos. La actividad GS transferasa se determinó según se describe en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 1 U . mg/proteína.

(— ○ —) sin adición; (— ● —) + NH₄Cl; (— □ —) + NH₄Cl + azaserina.

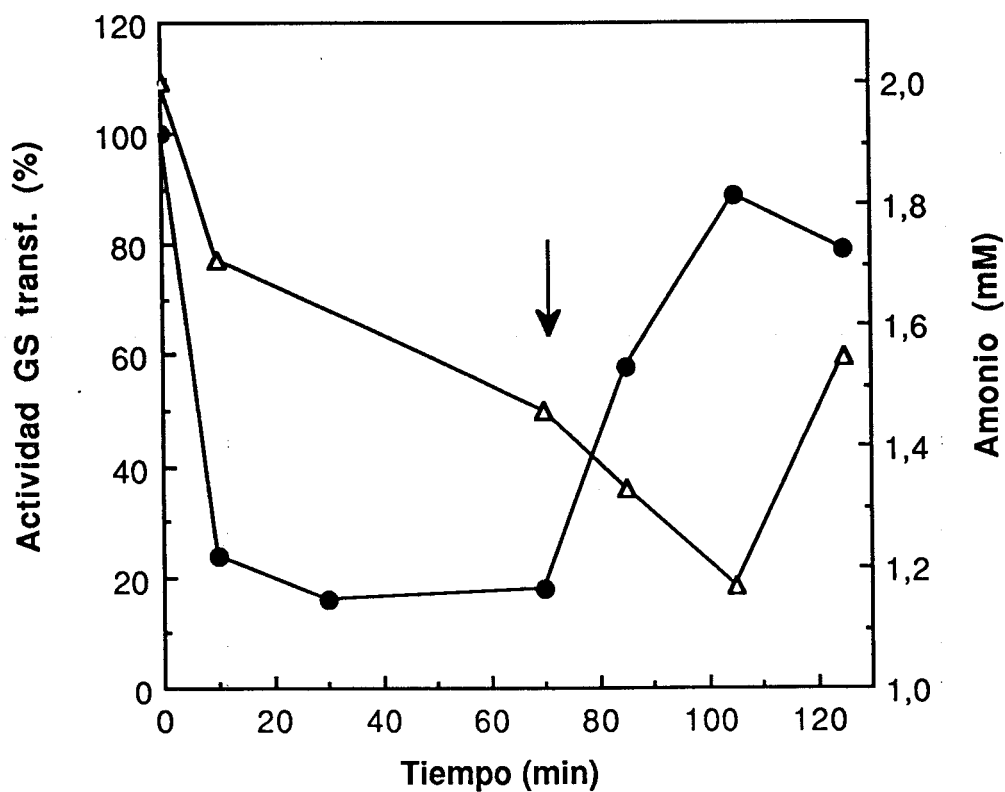


Figura 22.- Efecto de la azaserina sobre la actividad glutamina sintetasa y la asimilación de amonio en células de *Synechocystis* PCC 6803 tratadas con amonio

A células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato se les añadió, a tiempo 0, 2 mM de NH_4Cl (concentración final). La flecha indica la adición de 0,1 mM de azaserina al cultivo. La actividad GS transferasa se determinó según se describe en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 1 U / mg proteína. La concentración de amonio en el medio se determinó como se indica en II. E. 7.

(— ● —) actividad GS; (— Δ —) concentración de amonio

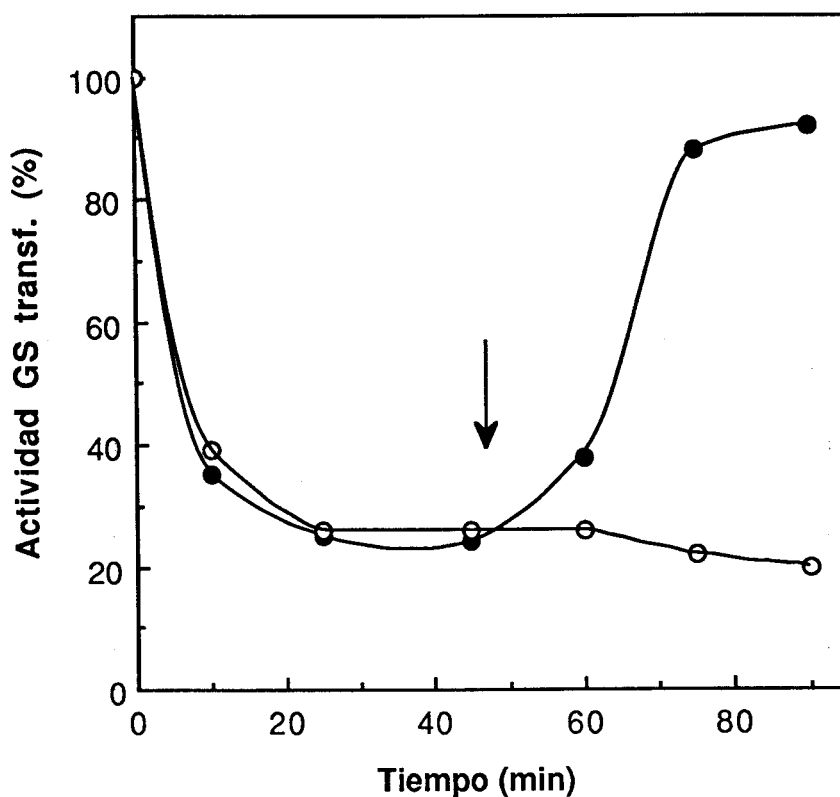


Figura 23.- Efecto de la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina sobre la actividad glutamina sintetasa de células de *Synechocystis* PCC 6803 tratadas con amonio

A células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato se le añadió, a tiempo 0, 2 mM de NH₄Cl (concentración final). La flecha indica la adición de 0,1 mM de DON a uno de los cultivos. La actividad GS transferasa se determinó según se describe en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 1 U / mg proteína.

(— ○ —) + NH₄Cl; (— ● —) + NH₄Cl + DON.

GS-GOGAT en células tratadas con estos inhibidores. Como se observa en la Tabla 7, la adición de azaserina a células tratadas con amonio provocó un considerable aumento en los niveles intracelulares de glutamina, como cabía esperar de una situación metabólica donde la glutamato sintasa esté inhibida, y un fuerte descenso en los niveles de glutamato, el cual no puede ser regenerado por la glutamato sintasa. Los resultados obtenidos en células tratadas con DON fueron similares a los conseguidos con azaserina.

Estos resultados indican que el aumento del nivel intracelular de glutamina no es la señal metabólica responsable de la inactivación de la glutamina sintetasa (o al menos no es la única señal), siendo necesaria su metabolización a través de la glutamato sintasa para conseguir dicha inactivación.

III. C. 9. EFECTO DE LA CARENCIA DE NITROGENO SOBRE LA INACTIVACION POR AMONIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Se ha estudiado el efecto de la carencia de nitrógeno sobre la inactivación mediada por amonio de la glutamina sintetasa. Células cultivadas en nitrato se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en medio de cultivo carente de fuente de nitrógeno y se incubaron en condiciones de cultivo (ver apartado II. A. 2. 1.). A distintos tiempos de incubación en este medio se suplementó a uno de los cultivos con 2 mM de NH_4Cl y se siguió la variación de la actividad glutamina sintetasa a lo largo del tiempo. En la Figura 24 se observa que a medida que aumentó el tiempo de cultivo en medio carente de nitrógeno la inactivación de la glutamina sintetasa fue más lenta, alcanzando en un mismo tiempo menor grado de inactivación que el control que no ha sido sometido a hambre de nitrógeno.

En condiciones de carencia de nitrógeno los niveles intracelulares de los compuestos carbonados empleados por la célula para la asimilación del nitrógeno deben experimentar un considerable aumento, por lo que podría pensarse que la acumulación de alguno(s) de estos compuestos carbonados estuviese previniendo la inactivación de la glutamina sintetasa mediada por amonio.

III. C. 10. VARIACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS TRÁS LA ADICION DE AMONIO A CELULAS SOMETIDAS A CARENCIA DE NITROGENO

El retardo en la inactivación de la glutamina sintetasa observado en las células sometidas a carencia de nitrógeno se ve reflejado también en el cambio de los niveles intracelulares de los aminoácidos después de la adición de amonio a estos cultivos. En la Figura 25 se observa que los niveles intracelulares de aminoácidos en condiciones de carencia de nitrógeno son bajos. La adición de amonio a estos cultivos provocó, al igual que ocurre en células cultivadas en nitrato, un rápido aumento en los niveles de glutamina conjuntamente con un descenso en los niveles de glutamato. Sin embargo, la posterior disminución en los niveles de glutamina, que en células cultivadas en nitrato se detecta ya a los 3 min (Figura 19), no se observó hasta los 15 min después de la adición de amonio al cultivo (Figura 25).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que es la inactivación de la glutamina sintetasa la que permite restablecer los niveles intracelulares de los aminoácidos relacionados con la ruta GS-GOGAT (glutamato y glutamina) a unos valores cercanos a los existentes antes de la adición de amonio al cultivo, de forma

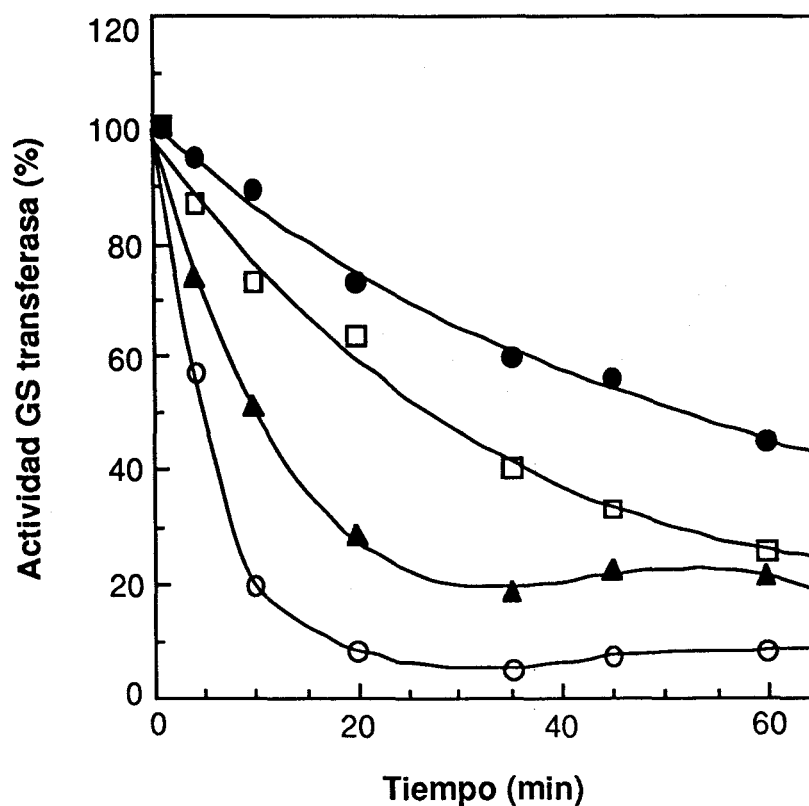


Figura 24.- Inactivación por amonio de la glutamina sintetasa en células de *Synechocystis* PCC 6803 sometidas a carencia de nitrógeno.

Células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato fueron transferidas a medio de cultivo carente de nitrógeno. A los tiempos 0 min (○); 15 min (▲); 90 min (□) y 240 min (●) se les añadió NH_4Cl a una concentración final de 2 mM. La actividad GS transferasa se determinó como se indica en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 0,97; 0,99; 1,2 y 1,4 U / mg proteína para los cultivos sometidos a carencia de nitrógeno de 0 a 240 min respectivamente.

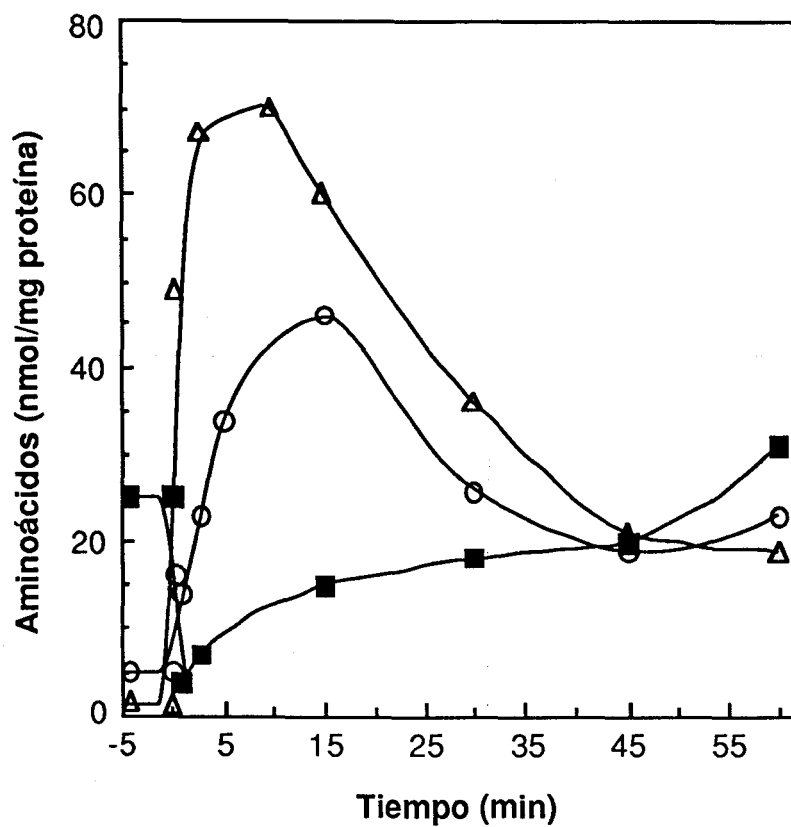


Figura 25.- Efecto de la adición de amonio sobre los niveles intracelulares de algunos aminoácidos en células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato

Células cultivadas en nitrato se incubaron durante 4 h en medio de cultivo carente de nitrógeno, añadiéndosele al cabo de ese tiempo 2 mM de NH_4Cl (concentración final). Los niveles de glutamato ; glutamina y aspartato, se determinaron como se describe en el apartado II. E. 2.

(— ■ —) glutamato; (— △ —) glutamina; (— ○ —) aspartato

que cuanto más lenta es ésta inactivación (células sometidas a carencia de nitrógeno) más lenta es la recuperación de los niveles de estos aminoácidos.

III. C. 11. NIVELES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS EN DISTINTAS CONDICIONES METABOLICAS

Continuando con el estudio de las señales metabólicas encargadas de modular el mecanismo de activación e inactivación de la glutamina sintetasa, se ha determinado el nivel intracelular de los principales aminoácidos en *Synechocystis* PCC 6803 en distintas condiciones metabólicas. Como se observa en la Tabla 8, los niveles de glutamato y aspartato en células cultivadas en amonio (líneas de cultivo celular a diferencia de los resultados mostrados en la Figura 20, obtenidos con células cultivadas en nitrato y tratadas durante una hora con amonio) fueron un 40 % inferiores a los determinados en cultivos en nitrato. La glutamina por el contrario presentó los mismos niveles en ambas fuentes de nitrógeno. La carencia de nitrógeno provocó una disminución general de los niveles intracelulares de los aminoácidos aunque las relaciones entre ellos permanecieron constantes. Por último, la adición de azaserina a células cultivadas en nitrato y tratadas durante una hora con amonio, condujo a un fuerte aumento en los niveles de glutamina junto con un descenso paralelo del nivel de glutamato. El resto de los aminoácidos estudiados no presentaron cambios significativos en las distintas condiciones estudiadas, mostrándose la serina como ejemplo de estos aminoácidos.

Los resultados obtenidos parecen descartar al glutamato y al aspartato como compuestos capaces de modular el grado de inactivación o activación de la glutamina sintetasa, ya que si bien sus niveles en células cultivadas en amonio

Tabla 8.- Niveles de aminoácidos en células de *Synechocystis* PCC 6803 en diversas condiciones metabólicas

<u>CONDICIONES</u>	<u>nmol / mg proteína</u>			
	Glu	Gln	Asp	Ser
NITRATO	54	4	13	7
AMONIO	33	5	8	6
AMONIO MAS AZASERINA	4	80	4	n.d.
CARENCIA DE NITROGENO	25	2	5	4

Se ha determinado la concentración intracelular de los aminoácidos mayoritarios en *Synechocystis* en distintas condiciones metabólicas : a) Células cultivadas en nitrato (20 mM); b) Células cultivadas en amonio (15 mM); c) Células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio (2 mM) durante 1 h y a continuación con azaserina (0,1 mM) otra hora más. y d) Células sometidas a carencia de nitrógeno durante 4 h..

La determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos se realizó como se describe en II. E. 2. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos.

n.d.- no determinado

(las cuales presentan una glutamina sintetasa en gran parte inactiva) fueron un 40 % menores que los observados en aquellas cultivadas en nitrato, en células sometidas a carencia de nitrógeno estos niveles descendieron aún más, por lo que no pueden ser los responsables de la atenuación de la inactivación de la glutamina sintetasa observada en estas células. Igualmente, estos niveles permanecieron bajos en células tratadas con azaserina, donde se observa una reactivación de la glutamina sinteta.

III. C. 12. EFEECTO DE DIVERSAS CONDICIONES METABOLICAS SOBRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE α -CETOGLUTARATO

Los resultados obtenidos con células sometidas a carencia de nitrógeno parecen indicar, como ya se ha comentado anteriormente, la existencia de un compuesto carbonado cuya acumulación relativa previene la inactivación por amonio de la glutamina sintetasa. Uno de estos compuestos, cuya acumulación cabe esperar en células cultivadas en carencia de nitrógeno, es el α -cetoglutarato, ya que es empleado por la enzima glutamato sintasa como esqueleto carbonado para la asimilación de amonio. Con objeto de comprobar la posible relación entre los niveles intracelulares de α -cetoglutarato y la actividad glutamina sintetasa, se ha determinado el nivel intracelular de este compuesto en distintas condiciones de cultivo. En la Tabla 9, se observa que en células cultivadas en amonio como fuente de nitrógeno el nivel de α -cetoglutarato fue un 40 % del detectado en células cultivadas en nitrato (0,10 y 0,25 nmol/mg proteína respectivamente). En células sometidas a carencia de nitrógeno durante 3 horas se observa una gran acumulación de α -cetoglutarato, alcanzando unos valores 7 veces superiores a los estimados en células cultivadas en nitrato (1,70 nmol/mg proteína). Igualmente, la

adición de azaserina una hora después de la adición de amonio a células cultivadas en nitrato, determina, junto con la reactivación de la glutamina sintetasa, un aumento en los niveles intracelulares de α -cetoglutarato, siendo estos tres veces superiores a los estimados en células cultivadas en nitrato (0,70 nmol/mg proteína).

Estos resultados establecen una relación entre los niveles intracelulares de α -cetoglutarato y el nivel de actividad glutamina sintetasa, observándose una mayor actividad glutamina sintetasa en condiciones metabólicas en las que el nivel de α -cetoglutarato es elevado, y menor actividad cuando el nivel de α -cetoglutarato es bajo.

Tabla 9.- Nivel de α -cetoglutarato en células de *Synechocystis* PCC 6803 en diversas condiciones metabólicas

<u>CONDICIONES</u>	<u>nmol α-cetoglutarato/mg proteína</u>
NITRATO	0,25
AMONIO	0,10
AMONIO MAS AZASERINA	0,70
CARENCIA DE NITROGENO	1,70

Se ha determinado en *Synechocystis* la concentración intracelular de α -cetoglutarato en distintas condiciones metabólicas : a) Células cultivadas en nitrato (20 mM); b) Células cultivadas en amonio (15 mM); c) Células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio (2 mM) durante 1 h y a continuación con azaserina (0,1 mM) otra hora más. y d) Células sometidas a carencia de nitrógeno durante 4 h..

La determinación del nivel intracelular de α -cetoglutarato se realizó como se describe en el apartado II.

E. 3. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos.

III. D. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA FORMA INACTIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *SYNECHOCYSTIS* PCC 6803

III. D. 1. ACTIVIDADES *IN VITRO* E *IN SITU* DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE CELULAS CULTIVADAS EN NITRATO TRATADAS Y SIN TRATAR CON AMONIO

Tal y como se muestra en el apartado III. C. 2., la adición de amonio a células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato provoca una rápida pérdida de actividad glutamina sintetasa. Como se observa en la Tabla 10 esta pérdida de actividad se detectó tanto en ensayos *in situ*, permeabilizando las células con MTA (apartado II. C. 1.), como en ensayos *in vitro* de extractos crudos libres de células preparados como se describe en II. B. La caída fue similar tanto en la actividad transferasa como en la actividad biosintética de la glutamina sintetasa.

Estos resultados parecen apoyar la idea de que la pérdida de actividad de la enzima no se debe a una simple inhibición por algunos efectores alostéricos, cuyos efectos inhibitorios desaparecerían al permeabilizar las células o en extractos celulares, sino más bien a una modificación estable de dicha enzima que determina la pérdida de su actividad enzimática.

III. D. 2. REACTIVACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA INACTIVADA POR AMONIO MEDIANTE TRATAMIENTO CON FOSFATASA ALCALINA

La regulación de la actividad glutamina sintetasa de la mayor parte de las bacterias gram negativas tiene lugar mediante un mecanismo de modificación covalente de la enzima, el cual implica la unión de una molécula de AMP a un

Tabla 9. - Actividades *in situ* e *in vitro* de la glutamina sintetasa de células de *Synechocystis* PCC 6803 cultivadas en nitrato, tratadas y sin tratar con amonio.

<u>Actividad GS</u> (mU/mg proteína)	<u>Condiciones de cultivo</u>		
	Nitrato	Nitrato+Amonio	Relación Nitrato / Nitrato+Amonio
<i>IN SITU</i>			
- Transferasa	955	83	11,5
- Biosintética	27	2,5	10,8
<i>IN VITRO</i>			
- Transferasa	555	61	9,1
- Biosintética	14	1,7	8,2

A células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato como fuente de nitrógeno se les añadió 8 mM de NH₄Cl (concentración final), determinándose la actividad GS en el cultivo antes y una hora después de la adición de amonio al mismo. Las actividades transferasa y biosintética de la GS se determinaron en células permeabilizadas con MTA tal como se detalla en los apartados II. C. 1. 1. y II. C. 1. 2 respectivamente.

A partir de cultivos de *Synechocystis* tratados y sin tratar con amonio tal como se ha descrito previamente, se obtuvieron extractos crudos libres de células tal como se indica en el apartado II. B. En estos extractos se determinaron las actividades transferasa y biosintética de la GS según se describe en los apartados II. C. 2. 1. y II. C. 2. 2.

residuo de tirosina de la cadena polipeptídica mediante un enlace fosfodiéster (una molécula de AMP a cada una de las subunidades de la enzima). Este enlace puede ser hidrolizado mediante el tratamiento *in vitro* de la glutamina sintetasa adenilada con la enzima fosfodiesterasa, obteniéndose una glutamina sintetasa deadenilada la cual presenta unas propiedades catalíticas bien diferenciadas de las de la enzima modificada (Stadtman y Ginsburg, 1974).

Con objeto de caracterizar el tipo de modificación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* hemos tratado con fosfodiesterasa extractos libres de células (obtenidos como se describe en el apartado II. B.) procedentes de células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio durante una hora, tiempo durante el cual la actividad glutamina sintetasa disminuye entre un 90 y un 95 %. Igualmente se han tratado estos extractos con fosfatasa alcalina, un tratamiento clásico en el estudio de enzimas interconvertibles ya que la fosforilación es uno de los sistemas más generales de modificación de enzimas (Weller, 1979). Como se observa en la Figura.26, la fosfodiesterasa no reactiva la glutamina sintetasa de *Synechocystis*, por lo que puede descartarse la presencia de un sistema de modificación por adenilación / deadenilación similar al descrito en un gran número de bacterias gram negativas. Por el contrario, la fosfatasa alcalina es capaz de reactivar a la enzima, recuperándose tras la incubación con esta enzima la actividad glutamina sintetasa mostrada por las células antes del tratamiento con amonio. Este resultado parece indicar que la inactivación de la glutamina sintetasa puede ser debida a la modificación por fosforilación de la enzima.

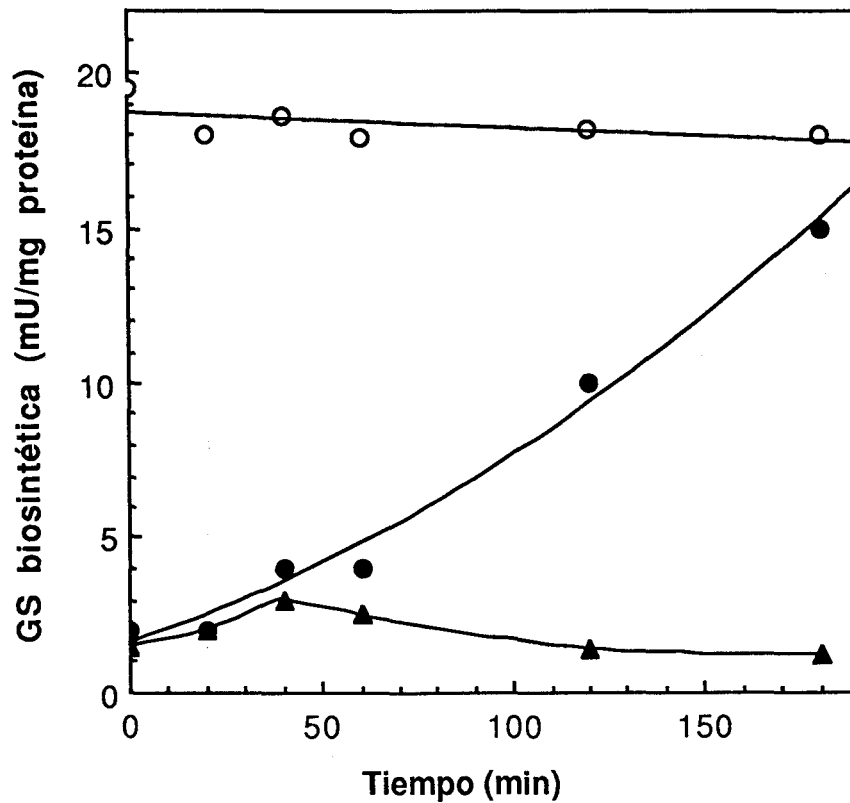


Figura 26 - Efecto del tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa sobre la actividad de la glutamina sintetasa inactivada por amonio

A partir de 1,5 l de cultivo en NaNO_3 (20 mM) de *Synechocystis* suplementado con 8 mM de NH_4Cl (concentración final), se obtuvo un extracto crudo libre de células tal como se describe en II. B. 1. A 1 ml de este extracto (37 mg proteína / ml) se le añadieron 30 U de fosfatasa alcalina (●) ó 40 U de fosfodiesterasa (▲) y se incubó a 37 °C. A los tiempos indicados en la figura se tomó una alícuota de la mezcla para determinar la actividad biosintética de la GS tal como se detalla en el apartado II. C. 2. 2.

(○) extracto sin adición.

III. D. 3. INHIBICION POR FOSFATO DE LA REACTIVACION POR FOSFATASA ALCALINA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Con objeto de comprobar que la reactivación de la glutamina sintetasa mediante tratamiento de la enzima inactiva con fosfatasa no es debida a otras actividades contaminantes, hemos realizado un estudio de las cinéticas de reactivación por fosfatasa alcalina en presencia de distintas concentraciones de fosfato, inhibidor competitivo de la fosfatasa alcalina (Weller, 1979). Como se comprueba en la Figura.27, a un mismo periodo de incubación, cuanto mayor era la concentración de inhibidor menor fue la reactivación de la glutamina sintetasa. Este resultado indica claramente que es la actividad fosfatasa la responsable de la reactivación de la glutamina sintetasa, apoyando la idea de la fosforilación de la glutamina sintetasa inactiva.

III. D. 4. MARCAJE *IN VIVO* CON ^{32}P DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE EL PROCESO DE INACTIVACION POR AMONIO

Células cultivadas en nitrato se incubaron, en condiciones de cultivo, en medio con baja concentración de fosfato (10 μM en lugar de 10 mM) para evitar un excesiva dilución del isótopo. Debido a que el fosfato se emplea también para tamponar el medio de cultivo y evitar su alcalinización durante el crecimiento de las células, el medio con baja concentración de fosfato se suplementa con HEPES-NaOH, pH 7,5 a una concentración final de 6 mM. Las células se incubaron en este medio durante 15 horas y al cabo de ese tiempo se añadió fosfato marcado radioactivamente con ^{32}P (200 μCi a 40 ml de cultivo con una concentración de clorofila de 10 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron en este medio durante 6 h en

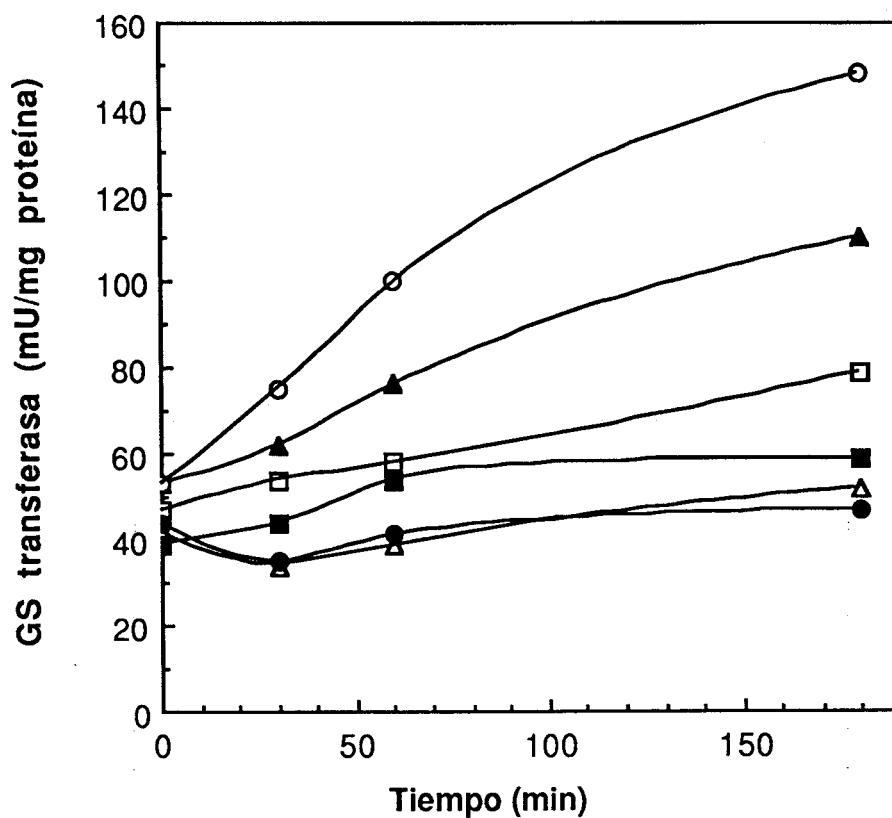


Figura 27.- Efecto del fosfato sobre la reactivación por fosfatasa alcalina de la glutamina sintetasa inactiva.

Alicuotas de 0,1 ml de extracto (42 mg proteína / ml) conteniendo GS inactiva, obtenidos tal como se detalla en la Figura 26, se incubaron con 15 U de fosfatasa alcalina en presencia de cantidades crecientes de fosfato. A los tiempos indicados en la figura se tomó una alícuota para determinar la actividad transferasa de la GS (apartado II. C. 2. 1.) (— ○ —) sin adición ; (— ▲ —) 20 mM de fosfato; (— □ —) 50 mM de fosfato; (— ■ —) 100 mM de fosfato; (— △ —) 200 mM de fosfato; (— ● —) 200 mM de fosfato, sin fosfatasa alcalina

condiciones de crecimiento y a continuación el cultivo se suplementó con NH_4Cl a una concentración final de 2 mM. Tras 1 h de incubación en estas condiciones se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7. La rotura de las células se realizó mediante su trituración tras congelación con aire líquido tal como se describe en el apartado II. B. 2. El extracto obtenido se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 10 min y una alícuota del sobrenadante obtenido se inmunoprecipitó tal como se describe en el apartado II. D. 1. 3. empleando anticuerpos mono-específicos obtenidos contra la glutamina sintetasa de *Synechococcus* PCC 6301. El precipitado se sometió a electroforesis en gel de poli-acrilamida con SDS y, una vez concluida la electroforesis, la radioactividad incorporada en las proteínas del gel se detectó mediante autorradiografía (apartado II. D. 2. 9.). No se detectó ninguna marca de incorporación de radioactividad en la autorradiografía en la posición del gel correspondiente a la glutamina sintetasa. Este experimento se realizó cuatro veces, no apreciándose marca alguna en ninguna de las ocasiones aunque en todos los casos se detectaron proteínas marcadas con ^{32}P .

III. D. 5. REACTIVACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA TRAS SU ELUCION DE UNA MATRIZ DE DEAE-CELULOSA MEDIANTE UN GRADIENTE DE KCl

Se ha intentado purificar la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 en su forma inactiva siguiendo el mismo método empleado para la forma activa (apartado II. A.). A partir de células cultivadas en nitrato y tratadas durante dos horas con amonio se obtiene un extracto libre de células mediante tratamiento del cultivo con ultrasonidos tal como se describe en el apartado II. B. 1. Este extracto presenta una actividad glutamina sintetasa que representa un 14 % de la detectada después de incubar una muestra de dicho extracto con fosfatasa alcalina durante 2

h. El extracto se aplicó a una matriz de intercambio iónico y se eluyó mediante un gradiente de KCl tal como se describe en el apartado III. A. 1. 1. Se determinó la actividad glutamina sintetasa en las fracciones resultantes antes y después de tratarlas con fosfatasa alcalina durante 2 h. Como se aprecia en la Figura 28, la glutamina sintetasa se reactivó en su mayor parte después de ser eluida de la columna, representando la actividad glutamina sintetasa de las muestras antes del tratamiento con fosfatasa alcalina un 70 % de la detectada después de dicho tratamiento. La purificación se continuó empleando un gel de afinidad de 2', 5'-ADP-sefarosa pero la glutamina sintetasa pura obtenida tras la elución de esta columna estaba totalmente reactivada.

Hemos atribuído la reactivación obtenida durante la elución de la columna de intercambio iónico al aumento de la fuerza iónica del medio producida durante la elución con el gradiente de KCl. Para comprobar esta hipótesis hemos añadido KCl o NaCl a distintas concentraciones finales al extracto crudo con glutamina sintetasa inactiva, observándose que en los extractos crudos suplementados con KCl o NaCl a una concentración superior a 0,5 M se obtiene, al cabo de varias horas de incubación de la muestra a 30 °C, una reactivación de la enzima, aunque ésta es menor que la obtenida con fosfatasa alcalina. La menor reactivación conseguida en este caso podría ser debida al diferente entorno en el que se encuentra la enzima: en solución acuosa en un caso y adherida a la matriz de DEAE-celulosa en otro.

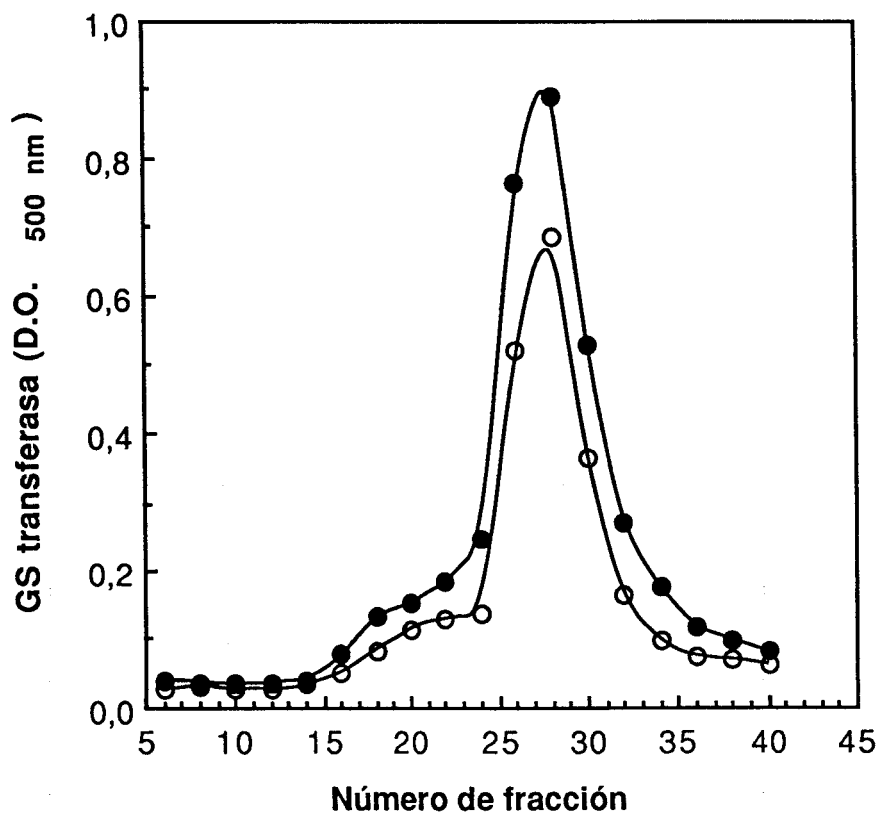


Figura 28 .- Elución de glutamina sintetasa inactiva de una columna de intercambio iónico mediante un gradiente de KCl

A partir de células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato y tratadas con amonio (8mM) 2 horas antes de ser recogidas, se obtuvo un extracto crudo libre de células (apartado II. B. 1.) conteniendo GS inactiva. Una alícuota de 20 ml de ese extracto se aplicó a una columna de intercambio iónico y se eluyó mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M de KCl. La actividad transferasa de las fracciones eluidas se determinó antes y 2 horas después de incubar 0,1 ml de dichas fracciones con 10 U de fosfatasa alcalina a 30 °C. La actividad transferasa se determinó siguiendo el método descrito en el apartado II. C. 2. 1.
 (— ○ —) sin adición; (— ● —) + fosfatasa alcalina.

III. D. 6. REACTIVACION POR pH ALCALINO DE LA GLUTAMINA SINTETASA INACTIVADA POR AMONIO

La reactivación de la glutamina sintetasa tras su elución de la columna de intercambio iónico, así como el hecho de que no se ha podido obtener enzima inactiva marcada con ^{32}P , nos hacen pensar que la inactivación de la glutamina sintetasa no se debe a la unión covalente de un grupo fosfato a la enzima. Otro resultado que apoya esta idea es la reactivación obtenida al aumentar el pH del extracto crudo conteniendo glutamina sintetasa inactiva. Alícuotas de extracto crudo, a pH 7, se filtran a través de Sephadex G-25 siguiendo el método de Penefsky descrito en el apartado II. D. 1. 5. Los geles se equilibran en diferentes tampones a distintos pH, obteniendo tras la filtración extractos crudos a unos pH que varían entre 6 y 10. Estos extractos se incuban a 30 °C y se sigue la variación de la actividad glutamina sintetasa a lo largo del tiempo. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos, observándose que un pH superior o igual a 8 provoca la reactivación de la glutamina sintetasa, siendo esta reactivación equivalente, en tiempo y magnitud, a la obtenida con fosfatasa alcalina.

III. D. 8. COMPARACION DE PARAMETROS CINETICOS DE LAS FORMAS ACTIVA E INACTIVA DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Son diversas las formas en que la modificación de una enzima puede alterar su actividad enzimática *in vivo*, por ejemplo variando la afinidad de la enzima por algunos de sus sustratos (en el caso de la activación de la PPI : fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa por fructosa 2,6-bifosfato [Sabularse y Anderson, 1981]), o, como en el caso de la glutamina sintetasa de *Escherichia coli*; variando la dependencia

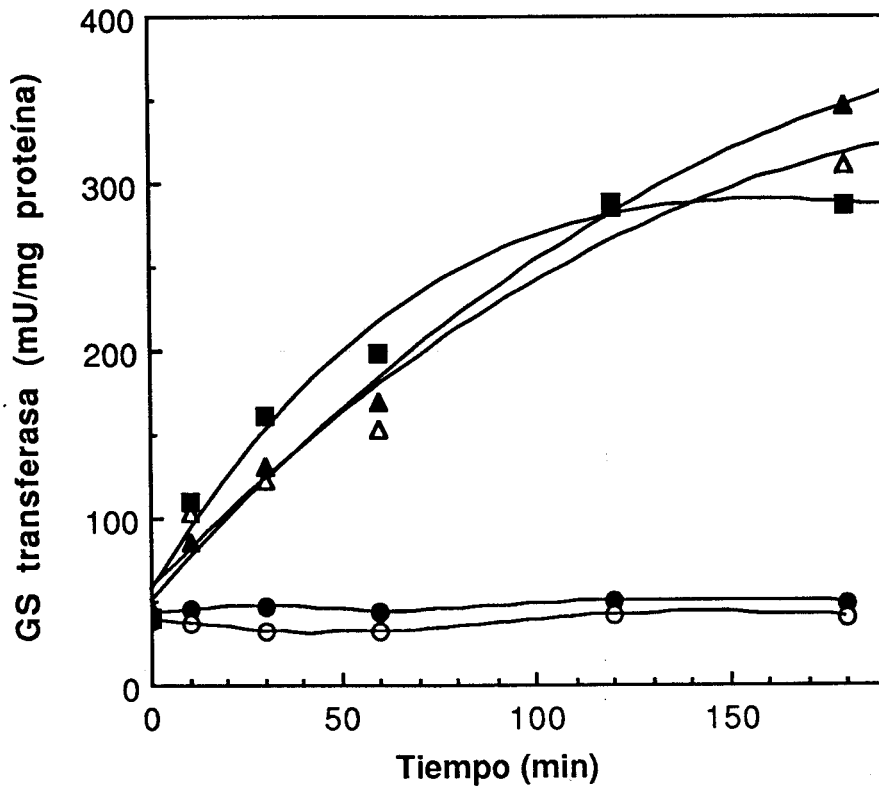


Figura 29.- Efecto de la incubación a distintos pH alcalinos sobre la actividad de la glutamina sintetasa inactiva.

Alicuotas de extracto crudo conteniendo GS inactiva, obtenido como se detalla en la Figura 26, se filtraron a través de Sephadex G-25 siguiendo el método de Peneksky descrito en el apartado II. D. 1. 5. El gel de filtración molecular se equilibró previamente en distintos tampones con los pH indicados en la Figura. Los extractos filtrados se incubaron a 30 °C y a los tiempos reseñados en la Figura se tomaron alícuotas de los mismos para determinar su actividad GS transferasa.

(— ○ —) pH 6,5; (— ● —) pH 7; (— △ —) pH 8; (— ▲ —) pH 9; (— ■ —) pH 10



de cationes de la enzima y aumentando su sensibilidad a la inhibición por diversos efectores alostéricos.

En la Tabla 11 se muestran los valores de las constantes de Michaelis de ambas formas de la glutamina sintetasa para sus sustratos fisiológicos, así como los valores de velocidad máxima alcanzada por las dos formas enzimáticas. Se observa que la modificación de la glutamina sintetasa no altera sensiblemente la afinidad por sus sustratos, siendo la velocidad de reacción la que se ve fuertemente disminuida en la enzima modificada: 40,5 mU / mg proteína de la enzima sin modificar frente a 4,5 mU / mg proteína de la enzima modificada.

III. D. 9 DEPENDENCIA DE CATIONES DIVALENTES DE LA ACTIVIDAD TRANSFERASA DE LA GLUTAMINA SINTETASA EN FORMA ACTIVA E INACTIVA

La modificación por adenililación de la glutamina sintetasa de *Escherichia coli* provoca un cambio en la dependencia de cationes divalentes tanto de la actividad transferasa como biosintética. Así, la actividad biosintética de la enzima sin modificar es dependiente de Mg^{2+} mientras que la de la enzima modificada es menor y dependiente de Mn^{2+} (Kingdon et al., 1967). Para el ensayo de la actividad transferasa, ambas formas son dependientes de Mn^{2+} aunque la enzima modificada se inhibe totalmente por 60 mM de Mg^{2+} mientras que la actividad transferasa de la enzima sin modificar es insensible a dicho catión (Stadtman y Ginsburg, 1974).

Tabla 11. - Comparación de diversos parámetros cinéticos de la actividad biosintética de la glutamina sintetasa en forma activa e inactiva.

<u>PARAMETRO</u>	<u>Glutamina sintetasa</u>	
	<u>Forma activa</u>	<u>Forma inactiva</u>
Km NH ₄ ⁺ (mM)	0,21	0,17
Km ATP (mM)	0,82	0,40
Km Glu (mM)	1,18	1,40
V _{máx} (mU/mg proteína)	40,5	4,5

A partir de células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato como fuente de nitrógeno y suplementadas con 8 mM de NH₄Cl dos horas antes de ser recogidas, se obtuvo un extracto celular conteniendo GS inactiva (apartado II. B. 1.) Las actividades transferasa y biosintética se determinaron como se describe en los apartados II. C. 2. 1. y II. C. 2. 2. respectivamente salvo que la concentración del compuesto estudiado en cada momento varió en un intervalo adecuado. El análisis de los datos de velocidades iniciales obtenidos se realizó mediante la representación de Lineweaver-Burk.

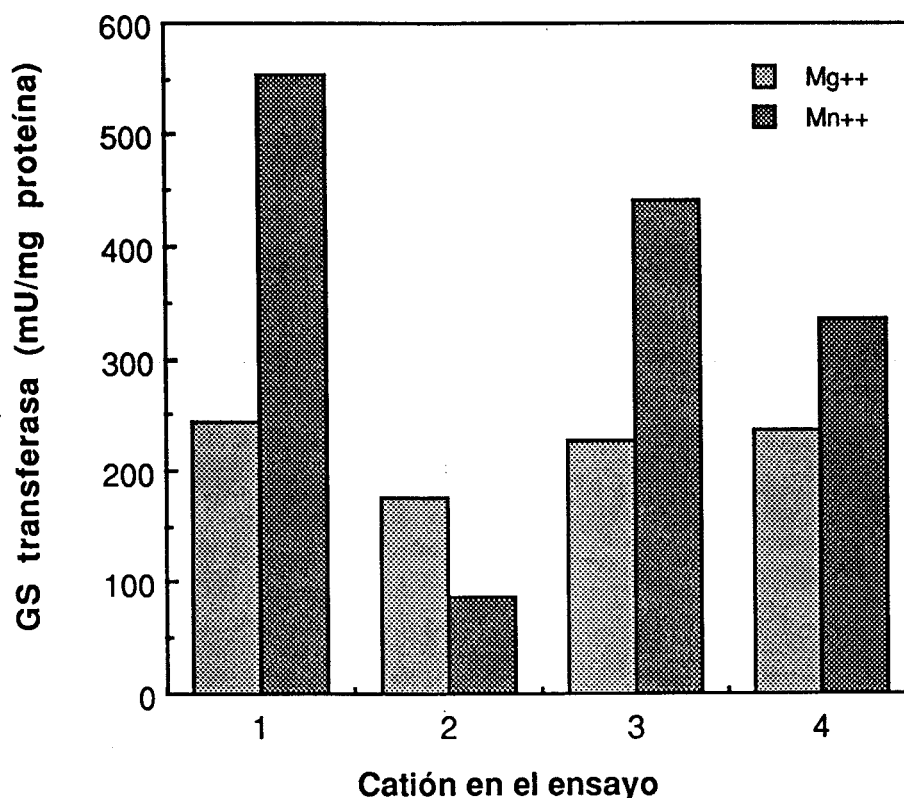


Figura 30 .- Dependencia de cationes divalentes de la actividad transferasa de las formas activa e inactiva de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803

Extractos crudos libres de células conteniendo GS activa o GS inactiva se obtuvieron a partir de células cultivadas en nitrato (GS activa) y de células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio (8 mM) 2 horas antes de ser recogidas (GS inactiva) respectivamente. El ensayo de actividad transferasa se realizó según se describe en el apartado II. C. 2. 1. empleando como catión divalente Mn^{2+} (5 mM) ó Mg^{2+} (50 mM)

- 1.- GS activa
- 2.- GS inactiva
- 3.- GS inactiva reactivada mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (Figura 26)
- 4.- GS inactiva reactivada mediante incubación a pH 9 a 30 °C (Figura 29)

En el caso de *Synechocystis* PCC 6803 el comportamiento de ambas formas enzimáticas respecto a los cationes es distinto al descrito en *Escherichia coli*, constituyendo este dato otra evidencia en contra de la existencia en *Synechocystis* de un sistema de regulación de la glutamina sintetasa mediante adenililación / deadenililación. En la Figura 30 se observa que la forma activa de la enzima fue dependiente, en el ensayo transferasa, del catión Mn^{2+} , por el contrario, la actividad transferasa de la forma inactiva, aunque menor, fue dependiente de Mg^{2+} . Se observa también que una preparación de enzima inactiva adquirió el mismo patrón de dependencia de cationes que la enzima activa tras ser tratada con fosfatasa alcalina o incubada a pH 9 durante 2 h.

Respecto a la actividad biosintética, se ha comprobado que ambas formas fueron dependientes de Mg^{2+} , siendo la actividad conseguida con Mn^{2+} sólo un 10 % de la alcanzada con Mg^{2+} .

III. D. 10.- INACTIVACION IN VITRO DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE SYNECHOCYSTIS PCC 6803

Otra aproximación al estudio del mecanismo de inactivación de la glutamina sintetasa distinto a la descrita hasta ahora ha sido intentar inactivar *in vitro* la glutamina sintetasa activa. En primer lugar se han llevado a cabo mezclas de extractos conteniendo glutamina sintetasa activa e inactiva y se han incubado dichas mezclas a 30 °C en presencia de distintos efectores como glutamina, α -cetoglutarato, ATP, ADP, glutamato y diversos cationes divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} en distintas combinaciones. En ninguno de los casos se ha observado inactivación de la parte de glutamina sintetasa activa de la mezcla o reactivación de la parte inactiva.

A la luz de los resultados obtenidos, uno de los posibles mecanismos de inactivación de la glutamina sintetasa es la unión a la enzima, de forma no covalente de un metabolito fosforilado, lo que explicaría las reactivaciones observadas por pH alcalino o durante la cromatografía de intercambio iónico. Siguiendo esta hipótesis se han realizado incubaciones de preparaciones de glutamina sintetasa pura con distintos compuestos relacionados con el metabolismo de la glutamina y del nitrógeno en general y que han sido descrito como inhibidores de la glutamina sintetasa de diversos organismos. En concreto se ha probado el efecto sobre la enzima del carbamil fosfato, glucosamina 6-fosfato y el ADP (un fuerte inhibidor de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* 6803 como se describe en el apartado III. B. 6.). Todas estas incubaciones se realizaron a 30 y 4 °C y en presencia de distintas combinaciones de otros efectores que podrían ser necesarios para la unión a la enzima del compuesto estudiado, como son el glutamato, amonio, glutamina, ATP y Mg^{2+} . En ninguno de los caso se observó una inactivación de la glutamina sintetasa que diera lugar a una enzima equivalente a la obtenida a partir de células tratadas con amonio.

III. E. CLONACION DEL GEN *glnA* DE *Synechocystis* PCC 6803

Hemos empleado una genoteca de *Synechocystis* PCC 6803 suministrada por el profesor Jack Preiss del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Michigan (EE.UU.). Esta genoteca ha sido realizada insertando fragmentos de ADN cromosómico de *Synechocystis* en el sitio *EcoRI* del fago λ -ZAP II, un derivado del fago λ .

III. E. 1. OBTENCION DE LA SONDA DE ADN .-

La sonda empleada en la hibridación correspondía a un fragmento de ADN de 1,4 Kb que contiene la mayor parte del gen *glnA* de *Anabaena* PCC 7120. Este fragmento se ha obtenido mediante restricción parcial con la enzima *EcoRI* del fragmento de 7 Kb de ADN de *Anabaena* del plásmido pRLE7 (ver Figura 33). El plásmido digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de 1,4 Kb se extrajo del gel tal como se describe en el apartado II. D. 2. 16. Este fragmento se clonó en el sitio *EcoRI* del plásmido pRL171 (plásmido construido por Elhai y Wolk, 1988) con objeto de aumentar la cantidad de ADN disponible para la hibridación. El plásmido resultante, pCSA1, se digirió con *EcoRI* y el fragmento de ADN de *Anabaena* de 1,4 Kb se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior extracción de dicho gel. Por último, este fragmento se marcó con ^{32}P según se describe en el apartado II. D. 2. 11.

III. E. 2. AISLAMIENTO DE LOS FAGOS QUE CONTIENEN EL GEN *glnA* DE *Synechocystis* PCC 6803.-

Una alícuota de la suspensión de fagos que constituían la genoteca, se empleó para infectar un cultivo de la estirpe de *E. coli* XL1-Blue, esta infección se

realizó en medio sólido, sembrando la suspensión de células con fagos en cajas de Petri de 15 cm de diámetro conteniendo medio LB (ver apartado II. A. 2. 2.). Una vez aparecidas los halos de lisis, éstos se transfirieron a filtros de nitrocelulosa tal como se describen en el apartado II. D. 2. 7.

La hibridación de los filtros de nitrocelulosa con la sonda de ADN marcada radioactivamente se realizó tal como se describe en el apartado II. D. 2. 8. En la autorradiografía de los filtros todas las calvas presentaron marca radioactiva, apareciendo seis cuya intensidad de marcaje era considerablemente mayor. Estas seis calvas se aislaron, extrayéndolas de la caja de Petri y resuspendiéndolas en tampón SM (NaCl, 100 mM; MgSO₄. 7 H₂O, 8 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5). Con cada una de las seis suspensiones de fagos obtenidas se procedió a una nueva infección de la estirpe XL1-Blue, transferencia a filtros de nitrocelulosa e hibridación con la sonda del *glnA* de *Anabaena*. Tras esta segunda hibridación se confirmó que en cinco de las suspensiones empleadas aparecían halos que incorporaban una elevada cantidad de radioactividad. De esta segunda infección se aislaron los halos que habían dado una señal positiva en la hibridación.

III. E. 3. EXTRACCION DEL FRAGMENTO DE ADN DE *Synechocystis* DEL FAGO λ -ZAP II.-

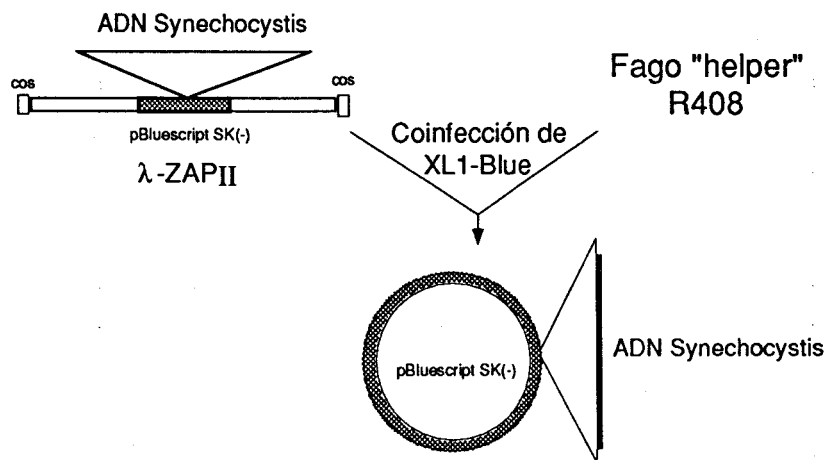
El fago λ -ZAP II ha sido construido sustituyendo la zona central, dispensable, del fago λ por el plásmido pBluescript SK (-), [para una descripción detallada de la construcción tanto del plásmido como de λ -ZAP II ver Short et al., (1988)]. En este fago, el plásmido pBluescript SK (-) está flanqueado por las secuencias de iniciación y terminación de replicación del fago f1, de forma que cuando se realiza una coinfección con los fagos λ -ZAP II y f1, las proteínas de este

último permiten la replicación del plásmido. Las cadenas, unicitenarias, de plásmido son recircularizadas por el producto del gen II de f1 y empaquetadas. De esta coinfección obtenemos pues, plásmidos pBluescript SK (-) empaquetados por f1, tras una posterior infección de una estirpe de *E. coli* con esta suspensión, se obtienen colonias que contienen el plásmido pBluescript SK (-).

De cada una de las cinco hibridaciones que dieron una señal positiva en la hibridación, se tomó un halo de lisis y se resuspendió en 1 ml de tampón SM. Una alícuota de 100 μ l de esta suspensión se mezcló con 10 μ l (aproximadamente 1×10^7 unidades formadoras de halos) de una suspensión del fago R408, un derivado del fago f1. Esta mezcla se añadió a 200 μ l de un cultivo en fase estacionaria de la estirpe XL1-Blue y se incubó 15 min a 37 °C. A continuación se le añadieron 5 ml del medio de cultivo 2XTY (apartado II. A. 2. 1.) y se incubó a 37 °C durante 5 horas. Al cabo de ese tiempo se calentó la suspensión a 70 °C durante 20 min con objeto de matar a las células, eliminando los restos celulares mediante centrifugación de la suspensión a 4.000 x *g* durante 5 min. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 2 μ l con la que se procedió a la infección de 200 μ l del cultivo de XL1-Blue. La suspensión de células y fagos se incubó durante 30 min a 37 °C y a continuación se sembró en dos cajas (100 μ l en cada una) de medio LB suplementado con 50 μ g de ampicilina por ml, que es el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido pBluescript SK (-). Después de una noche de incubación de las cajas a 37 °C se obtuvieron varios miles de colonias resistentes a ampicilina.

En la Figura 31 se esquematiza el proceso de clonación seguido y la excisión *in vivo* del plásmido pBluescript mediante la coinfección con el fago R408.

- A) Selección de 5 fagos mediante hibridación de la genoteca de *Synechocystis* en λ -ZAP II con el gen *glnA* de *Anabaena*
- B) Excisión *in vivo* del plásmido pBluescript con ADN de *Synechocystis* a partir de cada uno de los fagos seleccionados



- C) Transformación de la estirpe de *E. coli* ET6017 (*glnA*⁻) con cada uno de los cinco plásmidos obtenidos

Figura 31.- Esquema de la clonación del gen *glnA* de *Synechocystis* PCC 6803 mediante hibridación de un fragmento de *glnA* de *Anabaena* con una genoteca de *Synechocystis* en el fago λ -ZAP II y posterior complementación de la auxotrofia de glutamina de una estirpe de *E. coli* con delección en dicho gen.

III. E. 4. COMPROBACION DE LA PRESENCIA DEL GEN *glnA* DE *Synechocystis* EN LOS PLASMIDOS OBTENIDOS

La coinfección detallada anteriormente se realizó con un halo de lisis de cada una de las cinco hibridaciones que dieron señal positiva. De cada una de estas cinco coinfecciones se aisló una colonia resistente a ampicilina de la cual se extrajo su ADN plasmídico siguiendo el método descrito en II. D. 2. 2. Con estos plásmidos aislados se transformó la estirpe de *E. coli* ET6017, una estirpe que presenta delecionado su gen *glnA* (ver genotipo en Tabla 1), lo cual determina que sea auxótrofa de glutamina. Las células transformantes obtenidas, resistentes a ampicilina, se sembraron en medio mínimo M9 (ver composición en el apartado II. A. 2. 1) suplementado y sin suplementar con 5 mM de glutamina. De los cinco plásmidos obtenidos de la coinfección, sólo uno de ellos fue capaz de complementar la auxotrofia de glutamina de la estirpe ET6017. Para confirmar que este plásmido contenía el gen *glnA* se midió la actividad GS transferasa de los transformantes de ET6017 obtenidos con los cinco plásmidos. Sólo los transformantes que contenían el plásmido que complementaba la auxotrofia de glutamina mostraron actividad GS, confirmando que efectivamente este plásmido contiene, de forma integra, el gen *glnA* de *Synechocystis* .

III. E. 5. LOCALIZACION DE DIANAS DE RESTRICCION EN EL FRAGMENTO DE ADN DE *Synechocystis* QUE CONTIENE EL GEN *glnA*.

La primera caracterización del plásmido obtenido tras la complementación de la estirpe ET6017, denominado pAM1, ha consistido en el cálculo del tamaño del inserto de ADN de *Synechocystis* presente en dicho plásmido, así como en la localización en dicho inserto de dianas para distintas enzimas de restricción. ADN

de pAM1, aislado empleando el método de lisis alcalina tal como se describe en el apartado II. D. 2. 2., se sometió a restricción por diversas endonucleasas de restricción tal como se describe en el apartado II. D. 2. 18. Los resultados obtenidos han permitido confeccionar el mapa del plásmido pAM1 que aparece en la Figura 32.:

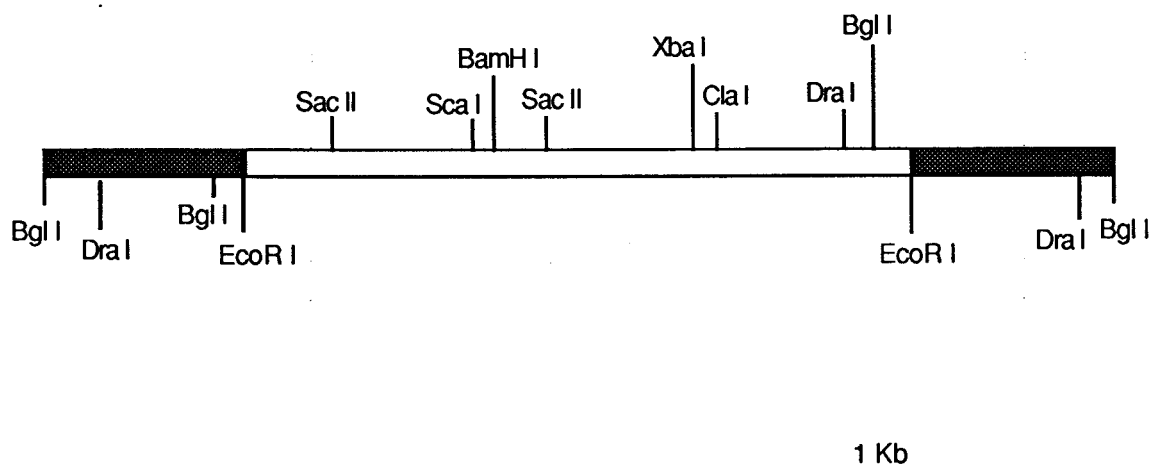


Figura 32.- Localización de dianas de restricción en el fragmento de ADN de *Synechocystis* del plásmido pAM1.

□ ADN de *Synechocystis* ; ■ pBluescript SK (-)

III. F. TRANSFORMACION DE *Synechocystis* PCC 6803 CON EL GEN *glnA* DE *Anabaena* PCC 7120

La glutamina sintetasa de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120, cianobacteria filamentosa fijadora de nitrógeno, muestra una regulación de su actividad por la fuente de nitrógeno disponible distinta a la estudiada en *Synechocystis* PCC 6803 (Orr y Haselkorn, 1982), de forma que en un extracto crudo libre de células obtenido a partir de células cultivadas en condiciones de fijación de dinitrógeno y a las que se les ha añadido amonio una hora antes de recogerlas, la actividad glutamina sintetasa es la misma que la medida en extractos de células que no han sido tratadas con amonio.

Basándonos en estos resultados, hemos llevado a cabo una serie de estudios encaminados a determinar donde radica la diferencia de la regulación de la glutamina sintetasa entre las dos cianobacterias. Así, se ha conseguido una estirpe de *Synechocystis* PCC 6803 que posee, aparte de su propio gen *glnA*, el gen *glnA* de *Anabaena* PCC 7120. Esta estirpe puede permitirnos comprobar si la glutamina sintetasa de *Anabaena* es susceptible de ser inactivada por el sistema de regulación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803.

III. F. 1. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pCSA6

La obtención de las estirpes AM 5 y AM 6 (estirpes de *Synechocystis* PCC 6803 que presentan los dos genes *glnA*) ha requerido la construcción de un plásmido que contuviera al gen *glnA* de *Anabaena* y que fuera capaz de recombinar con una zona dispensable del cromosoma de *Synechocystis*.

J. G. K. Williams (1988) ha estudiado el proceso de transformación en *Synechocystis*, observando que el ADN plasmídico se linealiza al introducirse en la célula, lo que determina que la inserción de ADN plasmídico en el cromosoma de la cianobacteria requiera dos hechos de entrecruzamiento. Para desarrollar este estudio han construido varios plásmidos que permiten la inserción de ADN foráneo en zonas dispensables del genoma de *Synechocystis*. En la Figura 33 aparece detallado uno de estos plásmidos, pKW1188, empleado en nuestro trabajo, así como el plásmido pRLE7 (E. Flores), un derivado del plásmido pAn503 (Fisher et al., 1981) el cual contiene un fragmento de 7 kilobases de ADN de *Anabaena* 7120 que incluye el gen *glnA*.

En la Figura 33 se resume la construcción de pCSA6 a partir de pKW1188 y pRLE7. El plásmido pRLE7 se digirió con la enzima de restricción *Hind* III y el fragmento de 7 Kb conteniendo a *glnA* se insertó en un "polylinker" simétrico del plásmido pRL479, este plásmido permite una selección positiva de aquellos vectores que posean un fragmento de ADN insertado en el polylinker, ya que aquellos que no lo presentan provocan que la mayoría de las estirpes de *E. coli* sean inviables (Elhai y Wolk, 1988). Esta construcción se digirió con la enzima *Pst*I y el fragmento de 7 Kb se insertó en la sitio de restricción *Pst*I del plásmido pKW1188.

Figura 33.- Construcción del plásmido pCSA6

La construcción del plásmido PCSA6 se detalla en el apartado III. F. 1. Las reacciones de ligación y restricción de ADN se realizó tal como se describen en los apartados II. D. 2. 17 y II. D. 2. 18.

III. F. 2. TRANSFORMACION DE *Synechocystis* PCC 6803 CON pCSA6

Una vez obtenido el plásmido, se transformó con él a *Synechocystis*. Como control de transformación hemos usado el plásmido pKW1188, del cual se ha demostrado previamente que permite la integración estable en el genoma de *Synechocystis* del gen *kan* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. La transformación se realizó tal como se describe en el apartado II. D. 2. 3., obteniendo colonias resistente a una concentración de kanamicina en el medio de 20 µg/ml. En la Tabla 12 se muestran las frecuencias de transformación obtenidas con ambos plásmidos.

Se observa que con pCSA6 la frecuencia de transformación baja drásticamente, de 1 por cada 500 células viables, para el plásmido pKW1188, a 1 por cada 3.500 para pCSA6. Este descenso puede ser atribuido al hecho de haber insertado un fragmento de 7 Kb entre las dos zonas de ADN cromosómico de *Synechocystis* de pKW1188 (ver Figura 33), ésta inserción probablemente dificulta en gran medida la entrada del plásmido en la célula, así como el doble hecho de recombinación entre las zonas de ADN cromosómico de pCSA6 y sus respectivas zonas homólogas en el genoma de *Synechocystis*.

III. F 3. ESTUDIO GENOTIPICO DE LAS ESTIRPES AM 4, AM 5 Y AM 6

Entre las colonias resistentes a kanamicina obtenidas tras las transformaciones de *Synechocystis* con los plásmidos pKW1188 y pCSA6 se han seleccionado las denominadas AM 4 (obtenida mediante transformación con pKW1188) y AM 5 y AM 6 (obtenidas con pCSA6). Para comprobar que la resistencia al antibiótico de estas estirpes se debe a la integración del plásmido en el cromosoma de la cianobacteria, se ha llevado a cabo una hibridación de

Tabla 12.- Frecuencia de transformación de *Synechocystis* PCC 6803 con los plásmidos pCSA6 y pKW1188.

	Plásmido empleado	
	<u>pCSA6</u>	<u>pKW1188</u>
N° viables / ml cultivo	10 ⁸	10 ⁸
N° transf / ml cultivo	3 x 10 ⁴	2 x 10 ⁵
Transformantes/viables	3 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻³

La transformación con ambos plásmidos se realizó siguiendo el método descrito en el apartado II. D. 2. 3., empleando entre 1 y 2 µg de ADN plasmídico en cada caso. La selección de las células transformadas se realizó en cajas con medio BG11 con nitrato (20 mM) como fuente de nitrógeno y suplementado con el antibiótico kanamicina (20 µg / ml).

ADN cromosómico de estas estirpes con el plásmido pKW1188 marcado radioactivamente con ^{32}P .

ADN cromosómico de cada una de las estirpes se digirió con la enzima de restricción *BamH* 1 y se sometió a electroforesis en gel de agarosa tal como se describe en el apartado II. D. 1. 2. 4. Los fragmentos de ADN del gel se transfirieron a un filtro de nylon (ver apartado II. D. 2. 9.) y dicho filtro se incubó con ADN desnaturalizado de pKW1188 marcado con ^{32}P a 65°C y agitación tal como se describe en el apartado II. D. 2. 10. En la Figura 34 se muestra la autorradiografía del filtro tras su incubación con la sonda radioactiva. La calle 2 corresponde a la estirpe silvestre y se observa el fragmento de aproximadamente 3 Kb correspondiente a los dos fragmentos de ADN (de 1,7 y 1,3 Kb) del plásmido pKW1188. La calle 3 corresponde a la estirpe AM 4, obtenida por transformación con pKW1188, en la figura se aprecian dos fragmentos, uno de 1,3 Kb correspondiente al fragmento del mismo tamaño del plásmido empleado como sonda y otro, un poco inferior a 3 Kb, que corresponde al fragmento de 1,7 Kb de ADN de *Synechocystis* de pKW1188 más el gen *kan* que confiere resistencia a kanamicina y que posee un tamaño de 1,2 Kb. Por último, las calles 4 y 5 pertenecen a las estirpes AM 5 y AM 6 respectivamente, en ellas sigue apareciendo el fragmento de 1,3 Kb y un nuevo fragmento de aproximadamente 10 Kb el cual corresponde a la suma del fragmento de 1,7 Kb de ADN de *Synechocystis*, el gen *kan* y el fragmento de 7 Kb de ADN de *Anabaena*. Se puede afirmar pues que las estirpes AM5 y AM6 poseen el fragmento de 7 Kb de ADN de *Anabaena*. Con objeto de facilitar la interpretación de la Figura 34, en la Figura 35 se esquematiza la composición genómica de la zona del cromosoma que hibrida con el plásmido pKW1188 en las estirpes silvestre, AM4 y AM5 (y AM6) de *Synechocystis*.

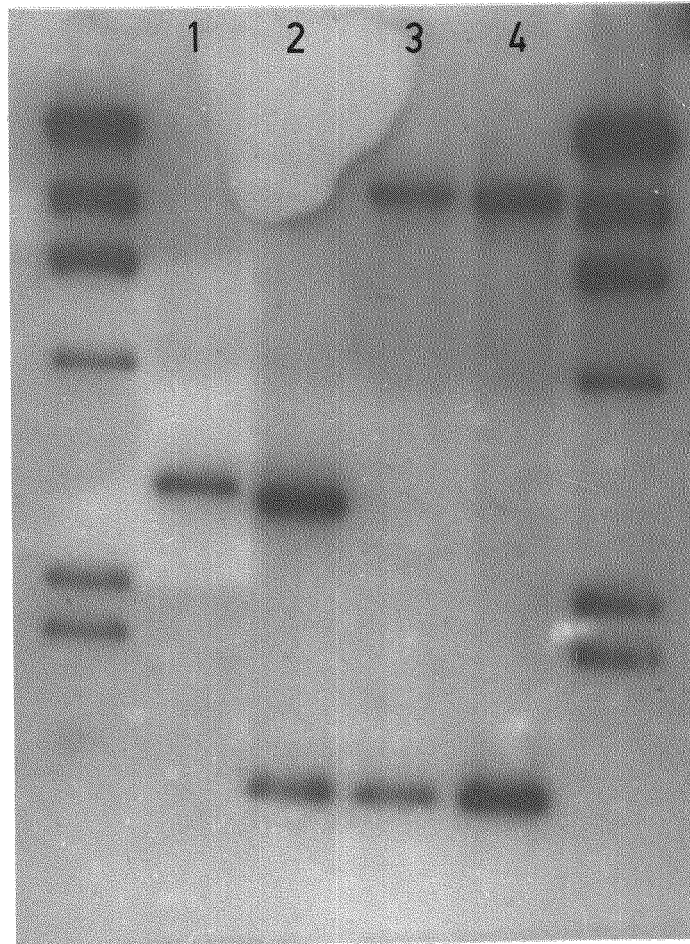


Figura 34 .- Hibridación de ADN cromosómico de las estirpes silvestre, AM4, AM5 y AM6 de *Synechocystis* con el plásmido pKW1188 marcado radioactivamente

El aislamiento de ADN cromosómico se realizó como se describe en II. D. 2. 1. El ADN se digirió con *BamH I* según se describe en el apartado II. D. 2. 18. La transferencia del ADN al filtro de nylon, la hibridación con la sonda radioactiva y la detección de la radioactividad incorporada al filtro se realizó según los apartados II. D. 2. 9., II. D. 2. 10 y II. D. 2. 12.

Patrón : ADN de λ digerido con *Hind III* ,Calle 1: Silvestre; Calle 2 : AM4; Calle 3 : AM5; Calle 4 : AM6.

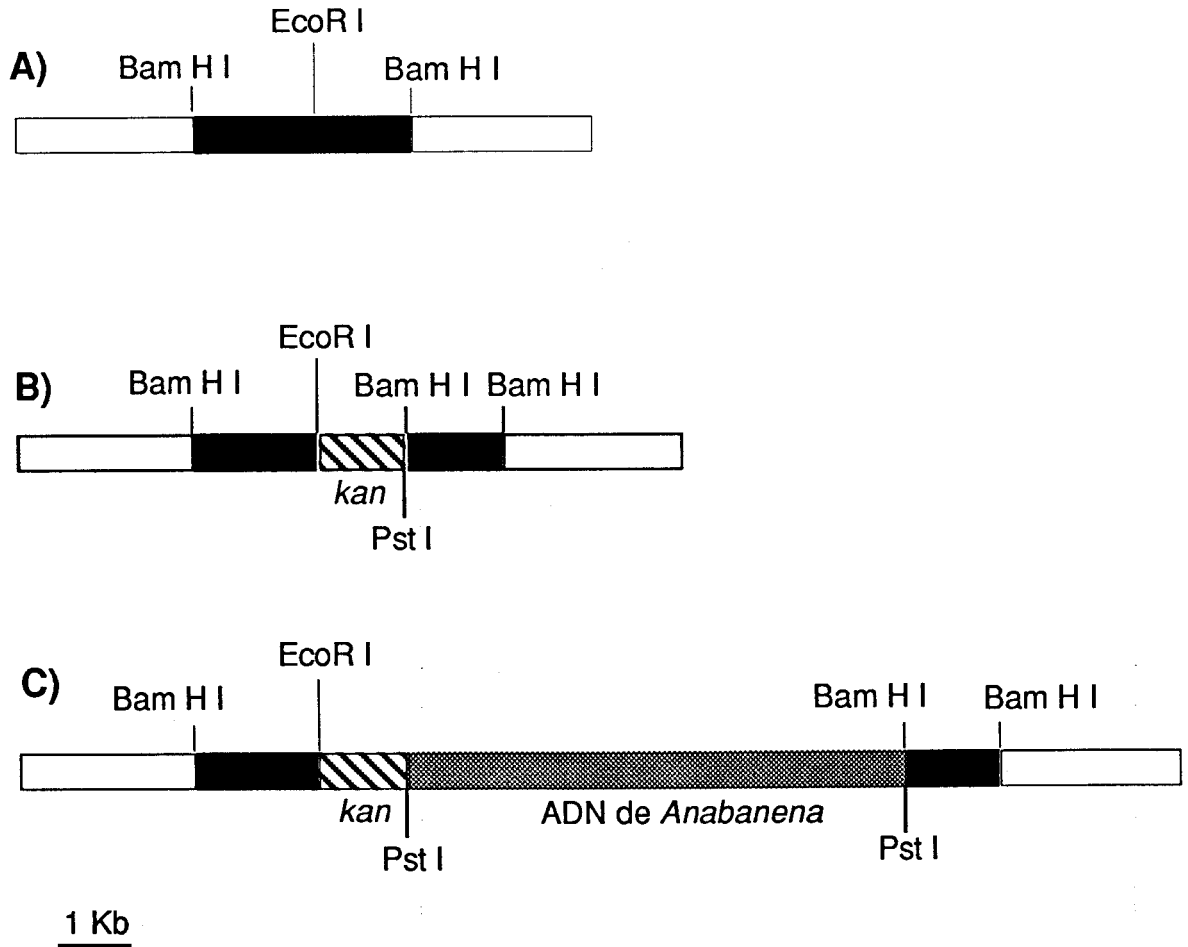


Figura 35 .- Composición genómica de la zona de cromosoma que hibrida con el plásmido pKW1188 de la estirpes silvestre, AM4, AM5 y AM6 de *Synechocystis*

□ ADN de *Synechocystis*, ■ ADN de *Synechocystis* presente en el plásmido pKW1188, ▨ gen *kan*, ▩ ADN de *Anabaena*

A) Silvestre; B) AM4; C) AM5 y AM6

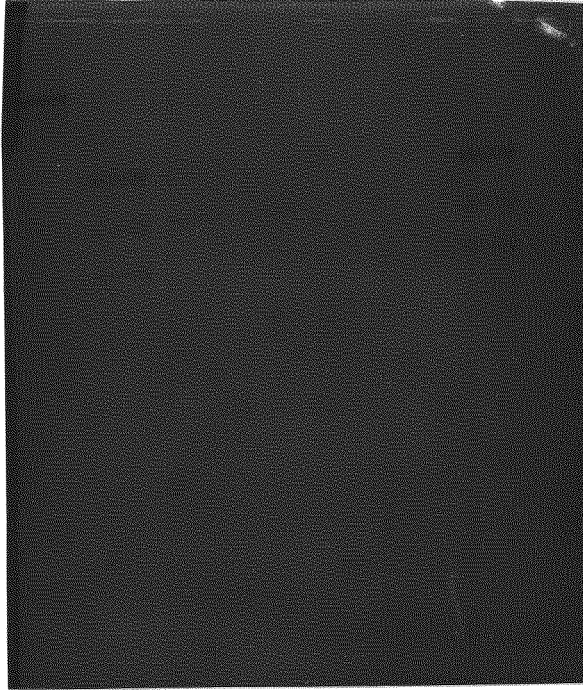


Figura 36 .- Hibridación de ADN cromosómico de las estirpes silvestre, AM4, AM5 y AM6 de *Synechocystis* con un fragmento de *glnA* de *Anabaena* marcada con digoxigenina

El aislamiento de ADN cromosómico se realizó como se describe en II. D. 2. 1. El ADN se digirió con *BamHI* según se describe en el apartado II. D. 2. 18. La transferencia del ADN al filtro de nylon, la hibridación con la sonda marcada y la detección de la hibridación se realizó según los apartados II. D. 2. 9., II. D. 2. 13 y II. D. 2. 15. respectivamente

Patrón : ADN de λ digerido con *Hind III* ,Calle 1: Silvestre; Calle 2 : AM4; Calle 3 : AM5; Calle 4 : AM6.

La comprobación de la presencia del gen *glnA* de *Anabaena* en estos transformantes se ha realizado también mediante hibridación, esta vez empleando como sonda de ADN el fragmento de 1,4 Kb del gen *glnA* de *Anabaena*. empleado para la clonación del gen de *Synechocystis* (apartado III. E.) Ese fragmento se marcó con digoxigenina tal como se describe en el apartado II. D. 2. 14. Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 36, se aprecia que ni las calles 2 y 3, estirpe silvestre y AM4 respectivamente, muestran hibridación con el gen *glnA* de *Anabaena*, apareciendo, marcaje por el contrario, en las calles 4 y 5, correspondientes a las estirpes AM5 y AM6. Puede afirmarse pues, que tanto la estirpe AM5 como la AM6 poseen el gen *glnA* de *Anabaena* integrado en su genoma.

III. F. 4. ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE LA ESTIRPE AM 6 DURANTE LAS DISTINTAS FASES DE CRECIMIENTO

Se ha estudiado la variación de la actividad glutamina sintetasa en la estirpe AM 6 a lo largo de las diversas fases de crecimiento del cultivo. En la Tabla 13 se muestran estos resultados junto con los obtenidos para la estirpe silvestre. Se puede observar que durante las distintas fases la actividad glutamina sintetasa de la estirpe AM 6 es un 40 % de la estimada para la estirpe silvestre. Se ha comprobado que la estirpe AM 4 muestra una actividad glutamina sintetasa equivalente a la de la estirpe silvestre. Las estirpes AM 4 y AM 6 presentan una inserción de ADN en la misma región del genoma de *Synechocystis*, el gen *kan* en el caso de AM 4 y este gen más 7 Kb de ADN de *Anabaena* en el caso de AM 6. El hecho de que la estirpe AM 4 muestre la misma actividad glutamina sintetasa que la estirpe silvestre parece indicar que la inserción de ADN en ésta región del genoma de *Synechocystis* no afecta a la actividad de la glutamina sintetasa de

Synechocystis . La menor actividad detectada en la estirpe AM 6 podría ser debida a la expresión de la glutamina sintetasa de *Anabaena* y posterior interacción entre los dos tipos de subunidades, la de *Synechocystis* y la de *Anabaena*.

Tabla 13- Crecimiento y actividad glutamina sintetasa a lo largo del mismo de las estirpes AM 6 y silvestre de *Synechocystis* PCC 6803.

TIEMPO DE CRECIMIENTO	<u>µg clorofila / ml</u>		<u>mU / µg clorofila</u>	
	<u>Silvestre</u>	<u>AM 6</u>	<u>Silvestre</u>	<u>AM 6</u>
0 h.	2,5	2,3	57	19
5 h.	4,4	4,6	58	27
20 h.	15,0	16,6	32	13
26 h.	18,1	19,7	28	11
30 h.	19,3	20,3	25	10

El cultivo de las dos estirpes se realizó en medio líquido con gaseo de 1,5 % (v/v) de CO₂, tal como se detalla en el apartado II. A. 2. 1. A los tiempos indicados en la Tabla se tomó una alícuota de los cultivos para determinar su concentración de clorofila (apartado II. E. 4.) y su actividad glutamina sintetasa. En la determinación de la actividad GS se empleó el ensayo transferasa descrito en el apartado II. C. 1.1.

IV. DISCUSSION

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *Synechocystis* PCC 6803

La glutamina sintetasa es una enzima clave en el metabolismo del nitrógeno de la gran mayoría de los organismos, habiéndose demostrado claramente que esta enzima, junto con la enzima glutamato sintasa, constituye la principal vía de asimilación de nitrógeno tanto en bacterias (Nagatani et al., 1971) como en plantas (Mifflin y Lea, 1976). Igualmente se ha demostrado, mediante marcaje radioactivo, que la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), normalmente denominada ruta GS-GOGAT, constituye la principal vía de asimilación de nitrógeno en cianobacterias (Wolk et al. 1976; Meeks et al., 1977; Meeks et al. 1978). La importante función que desempeña, ha determinado que la glutamina sintetasa haya sido ampliamente estudiada tanto en procariotas como en eucariotas, habiéndose purificado hasta homogeneidad en un elevado número de organismos.

Han sido múltiples los métodos empleados en la purificación de la glutamina sintetasa. Habiéndose empleado en primer lugar métodos de purificación por fraccionamiento del extracto crudo mediante precipitación con diversos compuestos; así, en el caso de la glutamina sintetasa de *Escherichia coli* el procedimiento empleado por Woolfolk et al. (1966) comprende un paso de precipitación con estreptomycinina junto con tres precipitaciones con sulfato amónico y una con acetona. Este método, a pesar de permitir la obtención de glutamina sintetasa pura, presenta serios inconvenientes. En primer lugar, los rendimientos obtenidos en cada paso son muy variables, oscilando la recuperación de actividad tras la primera precipitación con sulfato amónico entre un 40 y un 100 %. Además, el porcentaje de recuperación al final del proceso es extremadamente bajo, no

superando el 10 % de la actividad inicial. Por último, éste método tiene escasa aplicación en la purificación de la glutamina sintetasa de otros organismos, habiéndose comprobado su ineficacia en la purificación de la enzima de *Bacillus subtilis* (debido a la inactivación de la enzima en uno de los pasos de purificación - Deuel et al., 1970 -) y en algunas especies del género *Pseudomonas* (debido al bajo rendimiento obtenido -- Meyer y Stadtman, 1981 -). También la glutamina sintetasa de *Bacillus subtilis* se ha purificado mediante fraccionamientos por precipitación del extracto crudo (Deuel et al. 1970), en un proceso que comprende una precipitación con sulfato amónico y un tratamiento con calor, a 65 °C, en medio ácido. Este método presenta los mismos inconvenientes reseñados para el empleado en *Escherichia coli* , además, el porcentaje de recuperación obtenido calculado mediante la actividad biosintética dependiente de Mn^{2+} es distinto al calculado mediante la actividad dependiente de Mg^{2+} , lo cual puede indicar una severa alteración de la enzima a lo largo del proceso de purificación.

Más recientemente se han descrito métodos de purificación de glutamina sintetasa que emplean distintos tipos de cromatografía en columna. Lepo et al. (1979) han descrito la utilización de una cromatografía de afinidad empleando el gel azul-sefarosa, específico para enzimas que requieren nucleótidos, ya que el ligando del mismo, Cibacron azul F3GA, se une al dominio para dinucleótidos común a estas proteínas (Thompson et al., 1975; Thompson y Stellwagen, 1976). Esta cromatografía ha demostrado dar un buen resultado en la purificación de la glutamina sintetasa de diversos organismos como *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Lepo et al. 1979) y *Anabaena* PCC 7120 (Orr et al. 1981).



Una mejora en el método de purificación de la glutamina sintetasa lo constituye el empleo de una cromatografía de afinidad en gel de 2', 5'-ADP-Sefarosa, el cual muestra una mayor especificidad para la glutamina sintetasa que el gel de azul-sefarosa y ha demostrado su efectividad en la purificación de glutamina sintetasas de muy diversa procedencia, tales como las de raíz y hojas de arroz (Iyer et al. 1981), las dos isoenzimas de *Chlamydomonas reinhardtii* (Florencio y Vega, 1983) y la glutamina sintetasa de *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1 (Caballero et al. 1985). En este último organismo se ha empleado esta cromatografía como único paso en la purificación de la GS, obteniendo un rendimiento del 80 % en la recuperación de la actividad aplicada. Florencio y Ramos (1985) han purificado la glutamina sintetasa de la cianobacteria *Synechococcus* PCC 6301 (anteriormente denominada *Anacystis nidulans*) utilizando una cromatografía en 2', 5'-ADP-Sefarosa precedida de una de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Este método, con algunas modificaciones, es el que hemos empleado en la purificación de la enzima de *Synechocystis* PCC 6803.

Como se describe en el apartado III. A. la purificación de la glutamina sintetasa comprende la centrifugación a 16.000 x g del extracto crudo, una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa del sobrenadante obtenido y por último, la cromatografía de afinidad en 2', 5'-ADP-Sefarosa de las fracciones con actividad GS obtenidas tras la elución de la DEAE-celulosa. En el caso de *Synechococcus* es necesario un tratamiento del extracto crudo con el detergente iónico MTA como paso previo a la centrifugación con objeto de solubilizar gran parte de la glutamina sintetasa, la cual aparece asociada a los restos de membrana del extracto. En *Synechocystis*, este tratamiento no es necesario, ya que prácticamente la totalidad de la actividad glutamina sintetasa se encuentra en el sobrenadante tras la

centrifugación del extracto crudo. Este distinto comportamiento no indica una diferente localización intracelular de la glutamina sintetasa en las dos cianobacterias, asociada a membranas en *Synechococcus* y soluble en *Synechocystis*, ya que estudios de inmunolocalización de la glutamina sintetasa en *Synechococcus*, llevados a cabo por López-Ruiz et al. (1989), han puesto de manifiesto que la enzima se encuentra cercana a zonas ricas en tilacoides pero no asociada a sus membranas, proponiendo que el requerimiento de MTA durante la purificación de la enzima se debe a su unión inespecífica a la fracción de membranas, como un artefacto durante el proceso de rotura.

Aunque la purificación obtenida tras la cromatografía de intercambio iónico es pequeña (dos veces), este paso es necesario para eliminar proteínas que podrían competir con la glutamina sintetasa en la unión a las moléculas de 2', 5'-ADP durante la cromatografía de afinidad, saturando la columna. A diferencia de lo que ocurre en la casi totalidad de las glutamina sintetasas de cianobacterias, la enzima de *Synechocystis* no necesita la presencia de ningún compuesto estabilizante en el tampón empleado durante la purificación, como β -mercaptoetanol, EDTA y L-glutamato (Sampaio et al. 1979) o L-glutamato y Mg^{2+} (Stacey et al. 1977). Sin embargo, a pesar de la estabilidad de la enzima durante el proceso de purificación, la glutamina sintetasa de *Synechocystis* pierde totalmente su actividad tras una diálisis frente al mismo tampón empleado en la purificación, HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,0. Esta pérdida de actividad puede ser prevenida suplementando el tampón con 5 mM de $MnCl_2$, sugiriendo que la inactivación de la enzima puede ser similar a la descrita en *Escherichia coli*, donde la diálisis frente a un tampón carente de Mn^{2+} provoca la separación de iones Mn^{2+} asociados a la enzima, pasando ésta a una forma "relajada", carente de actividad enzimática (Denton y Ginsburg, 1969; Hunt et al. 1975). Un fenómeno similar se ha descrito

para la glutamina sintetasa de la cianobacteria filamentosa *Anabaena* CA (Stacey et al. ,1979).

La purificación de la glutamina sintetasa se completa con la cromatografía de afinidad en gel de 2', 5'-ADP-sefarosa. Tal como se observa en la Tabla 3, el ADP es el compuesto por el que la glutamina sintetasa de *Synechocystis* muestra mayor afinidad (K_m de 0,03 mM), mayor incluso que la afinidad por el ATP, sustrato fisiológico de la enzima, para el que presenta una K_m de 0,82 mM. Esta característica puede explicar el buen rendimiento de esta columna de afinidad en la purificación de la glutamina sintetasa, al permitir un fuerte lavado de la columna con tampón suplementado con KCl a una concentración de 0,4 M. Este lavado eluye de la columna la mayoría de las proteínas contaminantes sin que se detecte actividad glutamina sintetasa en las fracciones recogidas durante el mismo. La elución de la glutamina sintetasa requiere que se suplemente el tampón de elución con 2 mM de ADP, obteniéndose así fracciones de enzima pura sin necesidad de posteriores pasos de purificación. Es interesante destacar que la elución de la glutamina sintetasa del gel de 2', 5'-ADP-Sefarosa requiere tanto la presencia ADP como una concentración de KCl de 0,4 M, habiéndose comprobado que el ADP por si solo es incapaz de provocar la elución de la enzima. Este dato parece indicar que la unión de la glutamina sintetasa al gel de 2', 5'-ADP-Sefarosa presenta un componente de afinidad al ligando junto a otro de interacción iónica inespecífica a la matriz.

Las glutamina sintetasas de procariotas presentan una serie de características estructurales comunes, como el estar compuestas por doce subunidades idénticas, con un peso molecular aproximado de 50 kDa cada subunidad. Los estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto que las subunidades se disponen en dos anillos hexagonales superpuestos, formados

cada uno de ellos por seis subunidades (Stadtman y Ginsburg, 1974; Almassy et al. 1986). La misma estructura es la que presenta la glutamina sintetasa de las cianobacterias estudiadas hasta el momento : *Calothrix* PCC 7601 (Mérida et al., 1990), *Anabena* PCC 7120 (Orr et al. 1981) o *Phormidium lapideum* (Sawa et al. 1988). La movilidad de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* en geles de poliacrilamida en presencia de SDS permite calcular un peso molecular de 52 kDa para la subunidad de la glutamina sintetasa; la presencia de una sola banda indica además que todas las subunidades de la enzima son idénticas entre si.

La afinidad de la glutamina sintetasa por sus sustratos, tanto en el ensayo transferasa como en el ensayo biosintético, es similar a la descrita para las glutamina sintetasas de otras cianobacterias. En la Tabla.14 se establece una comparación de algunas características cinéticas y fisico-químicas de la glutamina sintetasa de varias cianobacterias. *Synechocystis* presenta altos niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (Florencio et al., 1987), sin embargo, la mayor afinidad por el amonio mostrada por la glutamina sintetasa (0,17 mM) respecto a la determinada para la glutamato deshidrogenasa (3,9 mM) determina que la asimilación de nitrógeno en condiciones de limitación de amonio en el medio (p.ej. con nitrato como fuente de nitrógeno), se realice a traves de la glutamina sintetasa, no habiéndose aún determinado si la GDH desempeña un papel asimilatorio cuando el contenido de amonio en el medio es alto.

Es necesario destacar que los valores de afinidad de la glutamina sintetasa por sus sustratos fisiológicos han sido calculados empleando un ensayo biosintético en el que se determina directamente la cantidad de glutamina producida durante la reacción. Este ensayo presenta una clara ventaja frente a otros métodos indirectos de determinación de la actividad biosintética de la enzima, como puede ser el ensayo acoplado a las reacciones de las enzimas piruvato

desconocemos la importancia real que pueda tener este factor en la regulación *in vivo* de la enzima de *Synechocystis*.

Junto con la disponibilidad de cationes, se ha propuesto que la regulación de la glutamina sintetasa de cianobacterias podría tener lugar mediante un sistema de inhibición alostérica por compuestos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, tales como glucosamina-6 fosfato, carbamil fosfato, aminoácidos o nucleótidos (Stacey et al., 1979; Dharmawardene et al. 1973; Sawhney y Nicholas, 1978, McMaster et al. 1980). En *Synechocystis*, hemos comprobado que el aspártico y la alanina inhiben de forma apreciable la actividad biosintética de la GS (41 y 52 % de inhibición respectivamente), cuando están presentes en el ensayo a una concentración de 1 mM. Si bien no conocemos la concentración intracelular de alanina en *Synechocystis*, la de aspártico oscila entre 1,5 y 3 mM (asumiendo un volumen intracelular de 5 μ l por cada miligramo de proteína [Ihlenfeldt y Gibson, 1975]), según que la fuente de nitrógeno suministrada sea nitrato a amonio respectivamente (ver Tabla 8). Igualmente se ha determinado la concentración intracelular de glutamato, la cual oscila, según la fuente de nitrógeno, entre 7 y 11 mM. Teniendo en cuenta que en el ensayo biosintético la concentración de glutamato es de 25 mM y que 1 mM de aspartato inhibe un 41% de la actividad GS, se puede concluir que la actividad glutamina sintetasa *in vivo* es considerablemente menor que la detectada en nuestros ensayos enzimáticos. Esta inhibición de la glutamina sintetasa por alanina o aspártico ha sido también descrita en el resto de las cianobacterias estudiadas, como *Anabaena cylindrica* (Sawhney y Nicholas, 1978), *Anabaena CA* (Stacey et al., 1979) *Synechococcus* PCC 6301 (Florencio y Ramos, 1985) o *Phormidium laminosum* (Blanco et al., 1989); sin embargo, no se observa inhibición por aspártico en la glutamina sintetasa de *Escherichia coli* (Woolfolk y Stadtman, 1964; Woolfolk y Stadtman, 1967). Por el

contrario, aminoácidos descritos como inhibidores de la mayoría de las glutamina sintetasa de cianobacterias, como son la serina y la glicina (Rowell et al., 1976; Sawhney y Nicholas, 1978; Orr y Haselkorn, 1981; Sawa et al. 1988), no muestran ningún efecto sobre la enzima de *Synechocystis*, al igual que ocurre en la glutamina sintetasa de la cianobacteria unicelular *Synechococcus* PCC 6301 (Florencio y Ramos, 1985). Este dato podría indicar una diferencia en el patrón de efectores alostéricos entre las glutamina sintetasa de cianobacterias unicelulares y filamentosas.

Respecto a la influencia de diversos aminoácidos sobre la actividad glutamina sintetasa es necesario resaltar el efecto diferencial que tienen algunos de ellos sobre las actividades transferasa y biosintética. En la Tabla 5 se observa que mientras que la serina y la glicina inhiben fuertemente la actividad transferasa, apenas tienen efecto sobre la actividad biosintética. Por el contrario, el aspártico, uno de los mayores inhibidores de la actividad biosintética, no afecta en absoluto la actividad transferasa. Estos datos ilustran la poca relevancia fisiológica que tiene la actividad transferasa en el estudio de la regulación de la glutamina sintetasa.

De los distintos efectores alostéricos posibles de la glutamina sintetasa, son los nucleótidos ADP y AMP los que más fuertemente inhiben a la enzima de *Synechocystis* PCC 6803, mostrando un 77 y un 67 % de inhibición respectivamente cuando están presentes en el ensayo a una concentración de 1 mM. Los estudios sobre el tipo de inhibición por ADP muestran que ésta es no competitiva respecto al glutámico (K_i de 0,28 mM) y competitiva respecto al ATP (con un valor de k_i de 0,11 mM), indicando una posible competencia por el sitio activo entre el ADP y el sustrato ATP. Una inhibición por ADP y AMP ha sido descrita previamente en las cianobacterias filamentosas *Anabaena cylindrica*

(Sawhney y Nicholas, 1978) y *Anabaena* CA (Stacey et al., 1979), sugiriéndose que la carga energética de la célula puede desempeñar un importante papel en la regulación de la actividad glutamina sintetasa en cianobacterias. En *Synechocystis* la inhibición por estos nucleótidos es aún más drástica que las descritas en *Anabaena*, donde 2 mM de ADP inhiben un 50 % de la actividad glutamina sintetasa (Sawhney y Nicholas, 1978). Un dato ilustrativo de la magnitud de la inhibición observada en *Synechocystis* es el hecho de que una razón ATP/ADP menor de 3 en el ensayo abole completamente la actividad glutamina sintetasa. No disponemos de datos sobre los valores intracelulares de ATP y ADP en *Synechocystis*, sin embargo, al ser el ADP uno de los productos de la actividad glutamina sintetasa, este compuesto podría ejercer un control de la actividad GS mediante un sistema de retroinhibición de la enzima.

Los estudios de inmunoprecipitación y doble difusión en gel realizados con la glutamina sintetasa de *Synechocystis* y *Synechococcus*, cianobacterias unicelular, y *Calothrix*, cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno, parecen indicar que esta enzima está altamente conservada dentro del grupo taxonómico de las cianobacterias, siendo reconocidas las tres glutamina sintetasas por los anticuerpos obtenido contra cada una de dichas enzimas. De estos resultados se deduce claramente que las glutamina sintetasas de *Synechocystis* y *Synechococcus* están más proximas entre sí de lo que lo están respecto a la de *Calothrix*. Además, se puede observar que, de las dos GS de cianobacteria unicelular estudiadas, la de *Synechocystis* es la más proxima a la GS de las cianobacterias filamentosas, representada en este caso por la de *Calothrix*. Estos datos se ven apoyados por los obtenidos por Bonen y Doolittle (1979) tras la comparación de la secuencia del ARN ribosómico 16S de diversas cianobacterias. Estos estudios sitúan a la especies del género de *Synechocystis* de alto contenido

en G+C (como es el caso de la especie PCC 6803) como precursor de las cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *Synechocystis* PCC 6803 : EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO

Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, la glutamina sintetasa es una proteína altamente conservada en cuanto a estructura entre los diversos organismos procariotas donde se ha estudiado (enterobacterias, bacterias fotosintéticas, bacilos o cianobacterias). Sin embargo, estas enzimas difieren ampliamente en los sistemas de regulación que presentan. En la mayoría de las bacterias gram negativas, la actividad GS está regulada por el balance intracelular de compuestos nitrogenados y no nitrógenados, representados por la glutamina y el α -cetoglutarato respectivamente (Senior, 1975). Una alta relación glutamina/ α -cetoglutarato determina, a través de una "cascada" de regulación formada por varias enzimas, la modificación covalente (adenililación) de la GS, siendo esta forma modificada de enzima más susceptible a la inhibición por diversos efectores alostéricos (Brown et al., 1971; Mangum et al., 1973; Stadtman y Ginsburg, 1974). Entre las bacterias gram positivas, mientras que las especies del género *Streptomyces* (Streicher y Tyler, 1981; Fisher y Wray, 1989) muestran una regulación por adenililación de la GS, las del género *Bacillus* por el contrario carecen de dicho sistema, presentando un regulación de la GS a través de un típico sistema por retroinhibición donde la glutamina ejerce una fuerte inhibición sobre la actividad de la enzima (Deuel et al., 1970; Hachimori et al., 1974; edler y Hoffmann, 1974).

En cianobacterias, bacterias gram negativas, se han realizado diversos estudios sobre la regulación *in vivo* de la GS en función de la fuente de nitrógeno disponible, aunque todos ellos han sido llevados a cabo en estirpes del género *Anabaena*, cianobacterias filamentosas, fijadoras de dinitrógeno (Rowell et al., 1977; Rowell et al., 1979; Stacey et al., 1979; Tuli y Thomas, 1981; Orr y Haselkorn, 1982). En algunos casos se ha observado un descenso en la actividad GS cuando se añade amonio a células cultivadas en condiciones de fijación de dinitrógeno (en ausencia de fuente combinada de nitrógeno) (Rowell et al., 1979; Tuli y Thomas, 1981). Sin embargo, el descenso de actividad es pequeño y lento, manteniendo las células el 75 % de la actividad GS inicial después de 25 h de la adición de amonio. En estas condiciones, la pérdida de actividad GS puede ser atribuida tanto a una ligera inactivación de la enzima como a una represión de la síntesis de la glutamina sintetasa y posterior dilución o degradación de la enzima durante el crecimiento del cultivo. En concreto, en *Anabaena* PCC 7120 se ha demostrado fehacientemente una represión de la transcripción de *glnA* cuando las células emplean amonio como fuente de nitrógeno en lugar del dinitrógeno atmosférico (Tumer et al., 1983). En *Synechocystis* hemos descrito una clara regulación de la actividad glutamina sintetasa mediada por amonio, demostrando, mediante técnicas de inmunoelectroforesis cuantitativa, que la pérdida de actividad glutamina sintetasa observada al añadir amonio a células cultivadas en nitrato no se debe a una degradación de la proteína sino a la modificación de la enzima a una forma inactiva (Tabla 7).

Como se aprecia en las Figuras 19 y 20, la adición de amonio a células cultivadas en nitrato induce un drástico cambio en los niveles intracelulares de los aminoácidos relacionados con la ruta GS-GOGAT, seguido por la restauración de estos niveles a unos valores cercanos a los existentes antes de la adición. Se ha

comprobado que esta alteración no tiene lugar si las células son previamente tratadas con MSX, un inhibidor de glutamina sintetasa (Pinkus, 1977). Este resultado, junto con el hecho de que la recuperación de los niveles de aminoácidos tiene lugar de una forma paralela a la inactivación de la GS, parecen indicar que es esta enzima la responsable de la primera alteración de los niveles de aminoácidos, metabolizando el amonio añadido al medio hasta glutamina, lo cual determina un gran aumento de este aminoácido y un concomitante descenso en el nivel de glutamato. A continuación, la inactivación de la glutamina sintetasa permite el restablecimiento de los niveles de aminoácidos hasta unos valores cercanos a los originales gracias a la actividad glutamato sintasa (GOGAT).

Estos resultados parecen indicar que la GS desempeña un importante papel en el mantenimiento de los niveles intracelulares de estos aminoácidos en un equilibrio dinámico, siendo los valores de estos niveles distintos según la fuente de nitrógeno suministrada, tal como se observa en la Tabla 8. La inactivación de la GS tras la adición de amonio al cultivo permite que el glutamato siga siendo el aminoácido mayoritario en *Synechocystis*, manteniendo la concentración de glutamina en unos niveles bajos. En este contexto es interesante mencionar que concentraciones de glutamina en el medio de cultivo superiores a 0,5 mM son tóxicas para *Synechocystis*. Una posible explicación de la rápida inactivación de la glutamina sintetasa en este organismo podría ser la necesidad de mantener el nivel intracelular de glutamina por debajo del nivel tóxico cuando se añade amonio al medio de cultivo. Por otro lado, Kustu et al. (1984) han observado que mutantes de *Salmonella typhimurium* incapaces de adenililar la GS cuando son transferidos a un medio rico en nitrógeno, presentan un tiempo de generación significativamente mayor que el de la estirpe silvestre. En estos mutantes el paso a un medio rico en nitrógeno provoca un enorme aumento en el nivel intracelular de glutamina y una

disminución de 10 veces del nivel de glutamato. Por el contrario, en la estirpe silvestre, el paso a un medio rico en nitrógeno determina un ligero aumento en el nivel de glutamina, permaneciendo prácticamente invariable el nivel de glutamato. Basándose en estos resultados, Kustu et al. (1984, 1985) han propuesto que una de las funciones de la adenililación de la glutamina sintetasa en *Salmonella* es impedir un excesivo y prolongado descenso del nivel intracelular de glutamato, lo cual disminuye ostensiblemente la viabilidad del organismo. En *Synechocystis* hemos observado que la adición de amonio a células cultivadas en nitrato determina un rápido descenso en el nivel de glutamato, el cual alcanza en 30 s un valor 8 veces inferior al existente antes de la adición. Al igual que en *Salmonella*, se podría pensar que una de las funciones de la inactivación de la GS provocada por amonio sería la de permitir la recuperación del nivel intracelular de glutamato hasta los niveles necesarios para mantener una normal viabilidad en las células de *Synechocystis*.

Flores et al. (1980) han estudiado la variación en los niveles intracelulares de glutamato y glutamina en la cianobacteria unicelular *Synechococcus* PCC 6301 en los 10 min siguientes a la adición de amonio a células cultivadas en nitrato, observando, al igual que ocurre en *Synechocystis*, un descenso en los niveles de glutamato y un paralelo aumento en los niveles de glutamina. Los autores constatan además que los cambios en los niveles de estos aminoácidos son debidos a la actividad GS ya que se previenen en células previamente tratadas con MSX.

Con objeto de compararlas con las obtenidas en *Synechocystis*, hemos determinado las variaciones de glutamato, glutamina y aspartato durante la hora siguiente a la adición de amonio a células de *Synechococcus* cultivadas en nitrato,

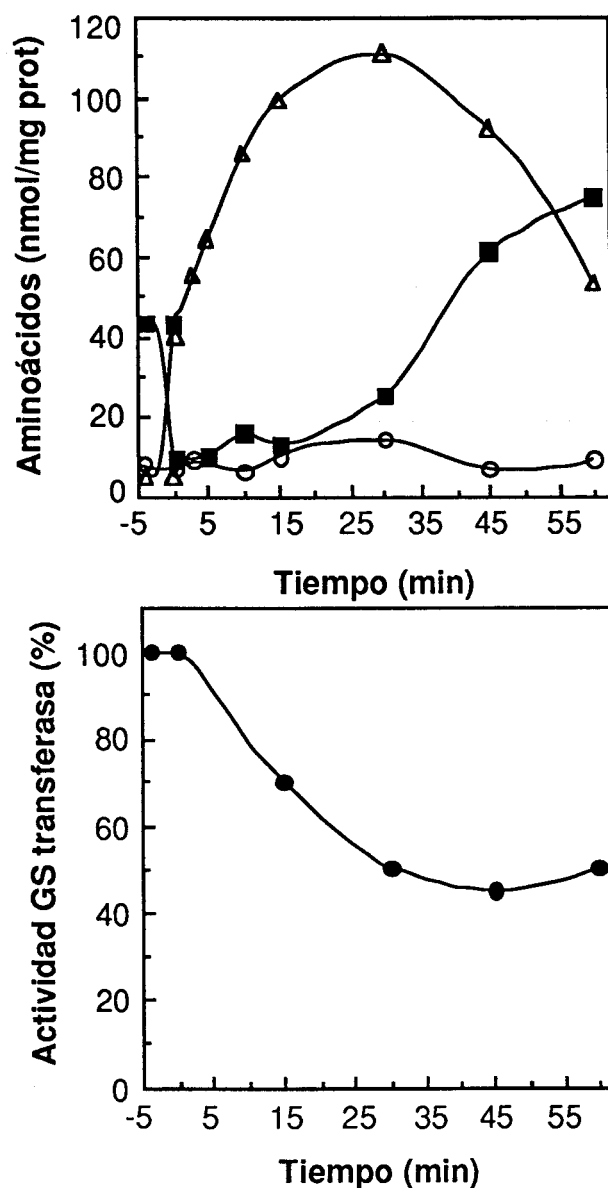


Figura 37.- Efecto de la adición de amonio sobre los niveles intracelulares de algunos aminoácidos en células de *Synechococcus* PCC 6301 cultivadas en nitrato

A) A células cultivadas en nitrato se le añadió NH_4Cl (2 mM, concentración final) a tiempo 0. Los niveles de glutamato (■); glutamina (Δ) y aspartato (○), se determinaron como se describe en el apartado II. E. 2. **B)** La actividad GS transferasa se ensayó como se describe en II. C. 1. 1. El 100 % de actividad corresponde a 1,4 U. mg/proteína.

relacionando además estos cambios con las variaciones de actividad GS a lo largo de este tiempo.

Como se aprecia en las Figuras 37 A y B, las variaciones observadas en los niveles de glutamato y glutamina tras la adición de amonio no son permanentes, apreciándose una lenta recuperación (a partir de los 25 min) de estos niveles hasta alcanzar unos valores próximos a los existentes antes de la adición. Igualmente se observa que la actividad GS decrece tras la adición de amonio a las células, aunque no alcanza los grados de inactivación detectados en *Synechocystis*, permaneciendo la actividad en un valor cercano al 50 % del detectado antes de la adición. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la recuperación de los niveles intracelulares de glutamato y glutamina se consigue gracias a la inactivación de la GS. En *Synechococcus*, la inactivación de la enzima es menor y, en consecuencia, la recuperación de los niveles originales de los aminoácidos es considerablemente más lenta que en *Synechocystis*.

Además de la anteriormente citada, una alteración similar a la observada en *Synechocystis* ha sido descrita recientemente en el alga verde *Selenastrum minutum* (Smith et al., 1989), donde los niveles intracelulares de glutamato y glutamina experimentan una alteración tras la adición de amonio al cultivo equivalente a la mostrada para *Synechocystis* en la Figura 20. Sin embargo, en este estudio no se ha seguido la variación de los niveles intracelulares de aminoácidos después de 3 min de la adición de amonio, por lo que desconocemos si a la alteración inicial en los niveles de estos aminoácidos le sigue una posterior restauración a unos valores próximos a los originales tal como ocurre en *Synechocystis*.

En las Figuras 19 y 20 se observa un aumento del nivel intracelular de aspartato tras la adición de amonio al cultivo, siendo este aumento posterior y de menor magnitud que el experimentado por la glutamina. En la cianobacteria *Anabaena cylindrica* se ha demostrado que la adición de amonio a células cultivadas en condiciones de fijación de dinitrógeno determina un cambio en la dirección de metabolización del oxalacetato, de manera que se favorece la síntesis de aminoácidos en lugar de la formación de succinato (Ohmori et al., 1989). El probable aumento de la disponibilidad de oxalacetato para la síntesis de aminoácidos, junto con la disminución detectada en el nivel de α -cetoglutarato (ver Tabla 9) podría favorecer la formación de aspartato desde glutamato y oxalacetato al añadir amonio a células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato, explicando así el incremento observado en el nivel de este aminoácido.

Como se ha señalado anteriormente, la actividad GS de la mayor parte de las bacterias gram negativas se regula mediante un sistema de cascada bicíclica, la cual está regulada en última instancia por el balance entre los niveles intracelulares de glutamina y α -cetoglutarato (Senior, 1975; Magasanik, 1988). El balance entre estos dos compuestos es utilizado por la célula como una señal indicativa del estado del nitrógeno en la célula, y modula una serie de mecanismos reguladores que implican tanto la regulación de la actividad como la transcripción de la GS, junto con otros procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, tales como el transporte y metabolización de arginina, histidina y glutamato entre otros aminoácidos (Reitzer y Magasanik, 1987).

En *Synechocystis* hemos llevado a cabo una serie de estudios encaminados a determinar qué señales metabólicas son las encargadas de modular la regulación de la actividad de la GS en respuesta a la fuente de nitrógeno

disponible. En este sentido, hemos determinado los niveles intracelulares de algunos aminoácidos en células cultivadas en nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, condiciones en las que la GS está activa e inactiva respectivamente. Como se muestra en la Tabla 8, los niveles de glutamato y aspartato en amonio son aproximadamente un 60 % de los detectados en células cultivadas en nitrato, siendo los niveles de glutamina prácticamente iguales en ambos medios. Los niveles de otros aminoácidos mostraron poca variación respecto a la fuente de nitrógeno, en la Tabla 8 se muestra como ejemplo de estos últimos a la serina. La glutamina ha sido propuesta como regulador del metabolismo del nitrógeno en hongos (Ferguson y Sims, 1974 a , 1974 b) y, como se ha comentado anteriormente, junto con el α -cetoglutarato, también en enterobacterias (Senior, 1975; Stadtman y Ginsburg, 1974). En nuestro caso, la escasa diferencia observada entre los niveles intracelulares de glutamina en las dos fuentes de nitrógeno, parece indicar que este aminoácido *per se* no es la señal metabólica encargada de modular la regulación de la GS. Esta conclusión se ve apoyada por los resultados obtenidos con azaserina, un inhibidor de GOGAT y transaminasas en general (Pinkus, 1977). La adición de 0,1 mM de azaserina a células de *Synechocystis* cultivadas en nitrato y tratadas con amonio durante una hora (tiempo suficiente para conseguir la inactivación de la GS), determina un rápido aumento de la actividad GS, alcanzando ésta unos valores cercanos al 80 % de la actividad existente antes de la adición de amonio (ver Figura 21). Esta reactivación tiene lugar a pesar del gran aumento en el nivel intracelular de glutamina que tiene lugar en estas células, provocado por la inhibición por azaserina de la GOGAT, principal vía de metabolización de la glutamina.

Como se comprueba en la Figura 22, el efecto de la azaserina sobre la actividad GS no es el resultado de la inhibición del consumo de amonio ya que se

observa reactivación de la GS a un tiempo en el que aún se detecta consumo de amonio. El posterior aumento en la concentración de amonio en el medio extracelular se debe a la liberación por azaserina de la inhibición del consumo de nitrato provocada por el amonio (Flores et al., 1983), en estas condiciones el nitrato del medio entra en la célula y es reducido hasta amonio por la acción de las enzimas nitrato y nitrito reductasas. Este amonio no puede ser metabolizado, debido probablemente a la gran disminución en el nivel intracelular de glutamato provocada por la inhibición de la GOGAT por azaserina (ver Tabla 8) y es por tanto excretado al medio.

Estos resultados indican que el aumento en el nivel intracelular de glutamina no es, o no es la única señal metabólica que determina la inactivación de la GS, siendo necesaria su metabolización a través de la GOGAT para que tenga lugar la inactivación de la enzima mediada por amonio.

Como se indicó anteriormente, la carencia de nitrógeno determina una atenuación en la inactivación de la GS mediada por amonio. En la Figura 24 se observa que, a medida que aumenta la duración del periodo durante el cual se somete a un cultivo a carencia de nitrógeno, más lenta es la inactivación de la enzima al añadir amonio a dicho cultivo. La carencia de fuente de nitrógeno puede estar provocando la acumulación en la célula de los esqueletos carbonados empleados normalmente en la asimilación de nitrógeno, la acumulación de uno de estos compuestos puede ser responsable de la menor inactivación de la GS en estas células.

En cianobacterias se ha demostrado la ausencia de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, lo que junto con la ausencia de actividad succinil

CoA sintasa determina que estos organismos presenten un ciclo de los ácidos tricarboxílicos incompleto (Pearce y Carr, 1967; Smith, 1973). La carencia de actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa implica que la principal vía de metabolización del α -cetoglutarato sea la de servir de esqueleto carbonado en la asimilación de amonio, por lo que unas condiciones metabólicas de carencia de nitrógeno pueden provocar un considerable aumento en los niveles intracelulares de este compuesto. Hemos determinado los niveles intracelulares de α -cetoglutarato en diversas condiciones metabólicas en las cuales *Synechocystis* muestra distintos niveles de actividad GS. Como se observa en la Tabla 9 las células cultivadas en amonio muestran sólo un 40 % del nivel de α -cetoglutarato presente en las células cultivadas en nitrato. Por otro lado, se observa que la adición de azaserina a células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio durante una hora provoca un aumento del nivel de α -cetoglutarato de tres veces con respecto a los valores existentes antes de la adición de amonio. Por último, un periodo de 4 h de carencia de nitrógeno provoca un aumento de 7 veces en el nivel de α -cetoglutarato respecto al de las células cultivadas en nitrato. Estos resultados pueden ser interpretados asignando al α -cetoglutarato un papel de modulador positivo en la regulación de la actividad GS en *Synechocystis*, de forma que un alto nivel de este compuesto determinaría una alta actividad GS, mientras que una baja concentración de α -cetoglutarato provocaría la inactivación de la enzima. Sin embargo, en células tratadas con azaserina no se consigue la total reactivación de la GS, a pesar de que el nivel de α -cetoglutarato aumenta unas tres veces respecto al que presentan las células en nitrato. Este dato podría indicar la existencia de un modulador negativo en la regulación de la enzima; en concreto, en las células tratadas con azaserina se observa un gran aumento en el nivel intracelular de glutamina, el cual podría ser el responsable de que la recuperación de la actividad GS no sea completa.

En la Tabla 15 mostramos una relación entre los niveles intracelulares de los compuestos de la ruta GS-GOGAT, glutamato, glutamina y α -cetoglutarato, y el nivel de actividad GS presente en las mismas condiciones señaladas anteriormente. En ella se puede observar que un cociente alto entre los compuestos carbononitrogenados de la ruta (glutamato y glutamina) y el compuesto no nitrogenado (α -cetoglutarato) coincide con una baja actividad GS, como ocurre en las células cultivadas en amonio. Por el contrario, un bajo cociente entre estos compuestos determina una alta actividad de la enzima, como se observa en células cultivadas en nitrato, tratadas con azaserina o sometidas a carencia de nitrógeno.

Tabla 15.- Relación entre los niveles intracelulares de los compuestos de la ruta GS-GOGAT y el nivel de actividad de la glutamina sintetasa en diversas condiciones metabólicas

<u>CONDICIONES</u>	<u>nmol / mg proteína</u>			Actividad GS (%)
	Glu	Gln	α KG	
NITRATO	54	4	0,25	100
AMONIO	33	5	0,10	5
AMONIO MAS AZASERINA	4	80	0,70	80
CARENCIA DE NITROGENO	25	2	1,70	120

Se ha determinado la concentración intracelular de los metabolitos de la ruta enzimática GS-GOGAT en distintas condiciones metabólicas : a) Células cultivadas en nitrato; b) Células cultivadas en amonio; c) Células cultivadas en nitrato y tratadas con amonio (2 mM) durante 1 h y a continuación con azaserina (0,1 mM) otra hora más. y d) Células sometidas a carencia de nitrógeno durante 4 h..

La determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos y α -cetoglutarato se realizó como se describe en los apartados II. E. 2. y II. E. 3. respectivamente. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos. La actividad GS transferasa se determinó tal como se detalla en el apartado II. C. 1. 1.

Respecto a los sensores metabólicos encargados de modular la regulación de la GS es interesante comentar los estudios realizados sobre la inhibición por amonio de la asimilación de nitrato en la cianobacteria unicelular *Synechococcus* PCC 6301. Flores et al. (1980) han demostrado una inhibición por amonio de la asimilación de nitrato en esta cianobacteria, habiéndose comprobado posteriormente que dicho efecto inhibitorio se ejerce sobre el transporte del ión al interior celular (Lara et al., 1987). Esta inhibición no tiene lugar en células tratadas con azaserina (Flores et al., 1980) y la carencia de nitrógeno provoca la liberación de la asimilación de nitrato de la inhibición por amonio (Flores et al., 1983). Se puede observar un gran paralelismo entre las respuestas de la asimilación de nitrato y la actividad GS respecto a la fuente de nitrógeno disponible: ambos procesos son inhibidos por la adición de amonio al medio y son liberados de esta inhibición al impedirse la metabolización de la glutamina mediante tratamiento con azaserina o en células sometidas a carencia de nitrógeno. Esta similitud puede indicar la existencia de un sensor metabólico común para ambos procesos, el cual se encargaría de modular la entrada de nitrato al interior celular y la asimilación de amonio a esqueletos carbonados. La existencia de elementos comunes en la regulación de la asimilación de nitrato y de la fijación de amonio a esqueletos carbonados ha sido recientemente demostrada en *Synechococcus* PCC 7942 , donde Vega-Palas et al. (1990) han descrito la existencia de un gen, *ntcA* , cuya mutación determina unos niveles de síntesis de GS inferiores en un 50 % a los existentes en la estirpe silvestre, así como la ausencia de síntesis de las enzimas nitrato y nitrito reductasa y de una proteína de membrana implicada en el transporte de nitrato al interior celular (Madueño et al., 1988; Sivak et al., 1989; Ohmata *et al.* 1989)

En las líneas anteriores hemos establecido un paralelismo entre las posibles señales metabólicas encargadas de modular la regulación de la GS en *Synechocystis* y las descritas en el bien conocido sistema de regulación de enterobacterias. Sin embargo, en enterobacterias se ha demostrado cómo la glutamina y el α -cetoglutarato modulan esta regulación, habiéndose descrito un efecto alostérico de estos compuestos sobre la enzima uridililtransferasa, la cual desencadena todo el proceso de regulación de la GS (Mangum *et al.* , 1973; Reitzer y Magasanik, 1987). En *Synechocystis* , la relación entre los valores de actividad GS y las concentraciones intracelulares de glutamina y α -cetoglutarato en diversas condiciones metabólicas, permiten pensar que dichos compuestos podrían desempeñar un papel de sensores metabólicos del estado de exceso o deficiencia de nitrógeno en el organismo, en un papel similar al que desempeñan en enterobacterias. No obstante, la demostración de este posible papel implica el conocimiento del resto de los elementos implicados en el sistema de regulación de la GS, de forma que se pueda comprobar el efecto de estos compuestos sobre algunos de los elementos del sistema. En este sentido, se ha descrito recientemente la presencia en *Synechococcus* PCC 6301 de una proteína que presenta un 63 % de identidad con la proteína P_{II} de *Escherichia coli* y 60 % con la de *Rhizobium leguminosarum* y que, al igual que en estos organismos, se puede encontrar en dos formas interconvertibles : con o sin un grupo UMP unido covalentemente a la proteína (Harrison *et al.*, 1990). Esta proteína se uridilila cuando el organismo se ilumina con luz absorbida preferencialmente por el fotosistema II, asignandosele una función en la regulación transcripcional del transporte electrónico fotosintético (Harrison *et al.* , 1990). Sin embargo, debido a la alta identidad de esta proteína con la P_{II} de enterobacterias y al hecho de que puede ser modificada por un mecanismo de uridililación, sería interesante comprobar si esta proteína está implicada en la regulación del metabolismo del

nitrógeno, así como estudiar si la actividad de la enzima encargada de uridililar a esta proteína es sensible al balance glutamina / α -cetoglutarato, al igual que ocurre en enterobacterias.

Hemos comprobado que la regulación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*, mediada por la fuente de nitrógeno disponible, se ejerce en dos niveles. En periodos cortos de tiempo después de la adición de amonio a células cultivadas en nitrato, se observa una inactivación de la enzima, sin que se aprecie disminución en el nivel de proteína GS en las células. Sin embargo, en células cultivadas en amonio como fuente de nitrógeno se detecta sólo un 50 % aproximadamente de la proteína GS determinada en células cultivadas en nitrato (ver Tabla 7). Estos datos sugieren la existencia de una represión de la síntesis de GS cuando la fuente de nitrógeno disponible es amonio. Un menor nivel de proteína GS en células cultivadas en amonio ha sido descrito en otras cianobacterias, como *Anabaena cylindrica* (Dharmawardene *et al.*, 1973), *Anabaena* PCC 7120 (Orr y Haselkorn, 1982), *Synechococcus* PCC 6301 (Florencio y Ramos, 1985) o *Calothrix* PCC 7601 (Mérida *et al.*, 1990). Turner *et al.* (1983) han demostrado que el menor nivel de proteína GS observada en *Anabaena* PCC 7120 cuando las células se cultivan en amonio, respecto a los niveles detectados en condiciones de fijación de dinitrógeno, se debe a una transcripción diferencial a partir de distintos promotores del gen *glnA*. La presencia de amonio en el medio de cultivo determina que disminuya la transcripción de *glnA* a partir de un promotor cuya secuencia es similar a la secuencia consenso de los promotores de los genes implicados en la fijación de dinitrógeno en esta cianobacteria (genes *nif*) y que tenga lugar transcripción a partir de otro promotor cuya secuencia se asemeja a la de la secuencia consenso de los promotores de *Escherichia coli* (Turner *et al.*, 1983; Rosenberg y Court, 1979). El resultado final de este cambio de

promotores en la transcripción de *glnA* es la disminución de ARNm de este gen, con la subsiguiente disminución de proteína GS, cuando en el medio de cultivo está presente el amonio.

En *Synechocystis* se podría pensar en la existencia también de una regulación de la síntesis de la GS mediante cambios de promotores en la transcripción del gen *glnA*, según la fuente de nitrógeno suministrada. En este sentido será interesante conocer las secuencias promotoras del gen *glnA* de *Synechocystis*, ya que se trata de una cianobacteria no fijadora de dinitrógeno. La comparación de estas secuencias con las del gen *glnA* de *Anabaena*, cianobacteria fijadora, permitiría un mayor conocimiento de los aspectos reguladores de la síntesis de la GS de cianobacterias en función de la fuente de nitrógeno disponible.

CARACTERIZACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA INACTIVA

Hemos comprobado que la pérdida de actividad GS provocada por amonio puede ser detectada tanto en ensayos *in situ*, en células permeabilizadas, como en ensayos *in vitro*, en extractos celulares. Esta pérdida de actividad se mantiene incluso después de pasar el extracto a través de un gel de filtración molecular Sephadex G-25, que elimina cualquier metabolito soluble que pudiera estar inhibiendo a la GS en el extracto (ver Tabla 10 y Figura 29). Estos resultados hacen pensar que la pérdida de actividad de la enzima se debe a una modificación covalente de la misma, la cual determina la inactivación de la GS.

Tal como se ha comentado previamente, las glutamina sintetasas de la mayoría de las bacterias gram negativas son reguladas a través de un sistema de modificación covalente por adenililación de un resto de tirosina de cada una de las subunidades de la enzima. Esta modificación no determina la inactivación de la GS sino un aumento en la sensibilidad de la enzima a distintos inhibidores alostéricos así como un cambio en la dependencia de cationes divalentes (Stadtman y Ginsburg, 1974; Ginsburg *et al.*, 1970). El enlace fosfodiéster entre el grupo AMP y el grupo hidroxilo del resto de tirosina puede ser hidrolizado *in vitro* mediante el tratamiento con la enzima fosfodiesterasa, obteniéndose una enzima con las mismas características cinéticas que antes de la adenililación.

En el caso de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*, hemos estudiado qué parámetros enzimáticos se ven afectados por la modificación de la enzima. En la Tabla 11 se observa que la afinidad por sus sustratos, amonio, ATP y glutamato, permanece invariable en ambas formas de la enzima, disminuyendo drásticamente la velocidad máxima de reacción, la cual varía de 40,5 mU / mg proteína en la forma sin modificar, a 4,5 mU / mg proteína en la modificada.

En la Figura 30 se muestra la dependencia de cationes de la enzima sin modificar; se observa que, para el ensayo transferasa, la enzima es dependiente de Mn^{2+} , siendo considerablemente menor la actividad detectada con Mg^{2+} . Por el contrario, la enzima modificada es dependiente de Mg^{2+} , mostrando con este catión aproximadamente el doble de actividad de la detectada con Mn^{2+} . Este dato apoya los estudios realizados previamente en otras cianobacterias los cuales descartan la regulación de la GS de cianobacteria mediante adenililación (Dharmawardne *et al.*, 1973; Fisher *et al.*, 1981), ya que la actividad transferasa de la enzima

adenililada es dependiente de Mn^{2+} y se ve fuertemente inhibida por Mg^{2+} . Respecto a la actividad biosintética, no se aprecia diferencia entre las dos formas enzimáticas, siendo ambas dependientes de Mg^{2+} , otra característica que la diferencia de las enzimas adenililadas, en las cuales la actividad biosintética es dependiente de Mn^{2+} .

La adición de amonio a células cultivadas en nitrato determina pues, un drástico descenso de la velocidad de reacción de la enzima, permaneciendo invariable la afinidad de la misma por sus sustratos así como su dependencia por el ión Mg^{2+} . Puede afirmarse por tanto, que el amonio provoca una verdadera inactivación de la enzima, a diferencia de lo que ocurre en las GS adenililadas.

Como se observa en la Figura 26, el tratamiento con fosfodiesterasa no tiene efecto alguno sobre la enzima inactiva de *Synechocystis*, lo cual aboga nuevamente contra la existencia de un mecanismo de adenililación en la regulación de la GS en este organismo. Por el contrario, se observa una recuperación de la actividad tras tratamiento de la enzima inactiva con fosfatasa alcalina, lo cual podría indicar que la inactivación de la enzima podría estar mediada por una fosforilación de la misma. Los resultados mostrados en la Figura 27 apoyan que la reactivación de la GS sea debida a una actividad fosfatasa, observándose que a medida que aumenta la concentración de fosfato en el ensayo, un inhibidor competitivo de la fosfatasa alcalina (Chappelet-Tordo et al., 1974), disminuye la reactivación de la GS.

Posteriores estudios de la enzima inactiva parecen descartar sin embargo la fosforilación como sistema de regulación de la GS en *Synechocystis*. Así, los intentos de marcaje *in vivo* con ^{32}P de la GS inactivada por amonio han resultado

negativos, a pesar de que se obtenían proteínas marcadas radioactivamente, demostrando que el marcaje *in vivo* había tenido lugar (apartado III. D. 4.). Igualmente contrarios a la idea de la existencia de una modificación covalente en la GS inactiva, han sido los resultados obtenidos en la purificación de esta forma de la enzima. Como se comenta en el apartado III. D. 5. su elución mediante fuerza iónica de una columna de DEAE-celulosa determina la casi total reactivación de la GS inactiva, habiéndose comprobado que una alta concentración de sales en el extracto celular también provoca la reactivación de la enzima.

Por otro lado, se ha observado reactivación de la GS inactiva tras el aumento en una unidad, de 7 a 8, del pH del extracto celular, obteniéndose una total reactivación de la enzima después de 2 h de incubación del extracto a 30 °C a este nuevo pH. Este tratamiento no parece que pueda hidrolizar un enlace fosfato, aunque podría estar activando, o aumentando la actividad, a una fosfatasa endógena, la cual sería la responsable de la reactivación observada. Se ha medido la actividad fosfatasa en extractos celulares de *Synechocystis* con GS inactiva, tanto a pH 7,0 como a 8,0, empleándose como sustrato el compuesto 4-nitrofenil fosfato, un sustrato general de fosfatasas (Weller, 1979). No se ha apreciado incremento alguno en la actividad fosfatasa del extracto al aumentar el pH de ensayo. Este resultado parece descartar que la reactivación de la GS por aumento de pH del extracto se deba a la activación de alguna fosfatasa endógena, sin embargo no puede descartarse totalmente ésta hipótesis ya que esta actividad podría no ser detectada con el sustrato empleado en el ensayo enzimático, o bien su actividad puede estar enmascarada por la de otras fosfatasas de *Synechocystis*.

La reactivación por aumento de pH, junto con la observada al incrementar la concentración de NaCl o KCl del extracto, parece indicar que la inactivación de la

GS no se debe a una modificación covalente, sino más bien a la unión electrostática de un compuesto a la enzima.

Una inactivación provocada por la unión no covalente de un metabolito a la enzima podría ser revertida mediante los tratamientos previamente descritos. Así, el aumento en la fuerza iónica o en el pH del extracto podrían debilitar la unión electrostática del compuesto a la GS, determinando la reactivación de la enzima. La reactivación observada con fosfatasa alcalina podría indicar la presencia de un grupo fosfato en el compuesto, la hidrólisis del cual provocaría también el debilitamiento de la unión del metabolito a la GS. Esta hipótesis explicaría la ausencia de marcaje radioactivo en la enzima, ya que los tratamientos empleados en el experimento, hervido de las muestras y electroforesis a pH 8,6 en presencia de SDS, podrían separar al compuesto unido a la GS.

Aunque es difícil pensar en la existencia de un compuesto inhibidor de la GS que ejerza su acción aún después de filtrar el extracto crudo a través de un gel de filtración G-25, están descritos ejemplos similares en la literatura. En concreto en hepatocitos de rata se ha observado que la fructosa 2,6 bisfosfato mantiene su efecto activador sobre la enzima fosfofructoquinasa incluso después de filtrar el extracto celular a través de un gel G-25 (Castaño et al., 1979; Hers y Van Schaftingen, 1982).

Basándonos en esta hipótesis, hemos intentado reconstituir *in vitro* la inactivación de la GS observada *in vivo*, incubando la enzima activa en presencia de diversos compuestos relacionados con el metabolismo del nitrógeno y que han sido descritos como inhibidores de la glutamina sintetasa de diversos organismos, como son el carbamil fosfato, descrito como un fuerte inhibidor de la GS de hígado

de rata, al unirse al sitio activo de la enzima (Tate et al., 1972), la glucosamina-6 fosfato, inhibidor de la GS de *Escherichia coli* (Stadtman y Ginsburg, 1974) y el ADP, que, como se ha comentado previamente, es un potente inhibidor de la GS de *Synechocystis* (apartado III. B. 6.). Estas incubaciones se han realizado en presencia de distintas combinaciones de diversos compuestos que podrían ser necesarios para la unión del inhibidor a la enzima, como son los sustratos de la enzima (ATP, glutamina y amonio), α -cetoglutarato, e iones divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}). En ninguno de los casos se ha obtenido una enzima inactiva de las mismas características que la obtenida a partir de células tratadas con amonio. Sin embargo, estos resultados negativos no excluyen que alguno de estos compuestos sea el causante de la pérdida de actividad de la GS, pudiendo ser necesario para la inactivación *in vitro* algún otro compuesto o condición que desconocemos.

CLONACION DEL GEN *glnA* DE *Synechocystis* PCC 6803

En cianobacterias se dispone, como ya hemos comentado, de la secuencia del gen de *Anabaena* PCC 7120, habiéndose clonado más recientemente la de la cianobacteria filamentosa no fijadora de nitrógeno *Spirulina platensis* (Riccardi et al., 1985) aunque se dispone de muy poca información sobre el gen y la enzima de esta cianobacteria. Respecto a las cianobacterias unicelulares parece ser que se ha clonado el gen de *Synechococcus* PCC 6301 (S. J. Robinson, datos no publicados), aunque desconocemos el trabajo que se está realizando con dicho gen.

Tal como se detalla en el apartado III. E., hemos clonado el gen *glnA* de *Synechocystis* mediante hibridación con un fragmento del gen de *Anabaena* marcado radioactivamente. La clonación mediante hibridación con sondas heterólogas es uno de los sistemas más empleados en cianobacterias debido a la ya comentada dificultad de introducir material genético en la mayoría de las cianobacterias (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987) lo cual hace a veces complicado el aislamiento de un gen mediante complementación de función en una estirpe mutada en dicho gen. Respecto a la GS de cianobacteria, esta aproximación no es posible debido a que no se dispone hasta el momento de ningún mutante carente de actividad glutamina sintetasa. En algunos casos se ha conseguido la clonación de un gen *glnA* por complementación de función en una estirpe de *E. coli* que presenta una delección en dicho gen, en concreto esta aproximación ha permitido la clonación del gen de maíz (Snustad *et al.* , 1988). En cualquier caso, debido al elevado grado de conservación del gen *glnA* entre los distintos organismos, el método más empleado en la clonación de este gen es la hibridación heteróloga con un gen *glnA* previamente clonado. Así, el gen *glnA* de *Anabaena* PCC 7120 se clonó mediante hibridación con el gen de *E. coli* (Fisher *et al.* , 1981), el gen de *Anabaena* se ha empleado en la clonación del *glnA* de *Spirulina platensis* (Riccardi *et al.* , 1985) y a su vez el gen de esta cianobacteria ha servido para clonar el de la arqueobacteria *Sulfolobus solfataricus* (Sanangelantoni *et al.* , 1990). En nuestro caso, esta técnica nos ha permitido aislar de una genoteca de *Synechocystis* un fragmento de ADN cromosómico de 5 Kb que contiene el gen *glnA*.

La clonación de este gen abre las puertas a una serie de interesantes estudios a realizar en este organismo, como es el estudio de la regulación de la síntesis de la GS en función de la fuente de nitrógeno. El análisis de la o las

secuencia promotoras de este gen permitirán establecer si el sistema de regulación de la síntesis de la GS observado en *Anabaena* PCC 7120 es general dentro de las cianobacterias. Además, el hecho de que esta cianobacteria sea menos compleja que *Anabaena* permitirá probablemente que este estudio pueda ser más exhaustivo que en la cianobacteria filamentosa, donde no se ha establecido con precisión el papel de algunas secuencia promotoras observadas (Tumer et al., 1983)

La disponibilidad del gen *glnA* de *Synechocystis* permitirá también esclarecer el papel fisiológico de la enzima glutamato deshidrogenasa presente en este organismo. Si bien los niveles de actividad GDH en esta cianobacteria son elevados (Florencio et al., 1987), se desconoce si esta enzima desempeña un papel en la asimilación de amonio en aquellas condiciones en las que hay abundancia de amonio en el medio (en condiciones de fuente pobre de nitrógeno, como nitrato, parece claro que la asimilación del nitrógeno se lleva a cabo a través de la ruta GS-GOGAT). La mutación de *glnA* *in vitro* por inserción de un gen de resistencia a un antibiótico y su posterior recombinación con el gen silvestre permitirá dilucidar el papel fisiológico de esta enzima en *Synechocystis* .

OBTENCION DE TRANSFORMANTES DE *Synechocystis* PCC 6803 CONTENIENDO EL GEN *glnA* DE *Anabaena* PCC 7120.

A pesar de la gran homogeneidad observada dentro de las cianobacterias respecto a la regulación de la síntesis de GS en función de la fuente de nitrógeno, la regulación de la actividad de la enzima en respuesta a cambios en la fuente de

nitrógeno presenta grandes diferencias dentro de este grupo de bacterias. Así, mientras que en *Synechocystis* PCC 6803 hemos descrito una pérdida del 90-95 % de la actividad GS después de 30 min de la adición de amonio a células cultivadas en nitrato, en *Synechococcus* PCC 6301 esta pérdida de actividad es tan sólo del 50 %, y en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* L-31 es sólo de un 25 % 24 h después de la adición de amonio (Tuli y Thomas, 1981), no pudiéndose descartar que se deba al efecto conjunto de represión de la síntesis y dilución por crecimiento y degradación de la GS existente.

A la vista de estos datos, hemos iniciado un estudio encaminado a comprobar si la GS de *Anabaena* PCC 7120, la cual muestra una regulación de la actividad GS equivalente a la descrita para *Anabaena* L-31, es susceptible de ser regulada de igual forma que lo es la enzima de *Synechocystis*. Para ello hemos obtenido en primer lugar una estirpe transformante de *Synechocystis* que posee, además de su propio gen *glnA*, el gen de *Anabaena* integrado de forma estable en el genoma de *Synechocystis*. A partir de esta estirpe pretendemos obtener otra que posea como único gen operativo el gen *glnA* de *Anabaena*, mediante inserción en el gen clonado de *Synechocystis* de un gen que confiera resistencia a un antibiótico y posterior recombinación de esta construcción con el *glnA* silvestre. Estudios de la regulación de la actividad de la GS de *Anabaena* en esta estirpe podrían aclarar algunos de los aspectos que determinan la diferencia entre las dos cianobacterias respecto a la regulación de esta enzima.

En la obtención de la estirpe transformante de *Synechocystis* que contiene los dos genes *glnA* hemos empleado el plásmido pKW1188 construido por J. G. K. Williams y L. McIntosh, los cuales lo han utilizado en un estudio sobre la integración de ADN foráneo en el cromosoma de *Synechocystis* PCC 6803. En este estudio



han llegado a la conclusión de que el ADN plasmídico se linealiza al entrar en la célula, por lo que su integración en el cromosoma requiere un doble hecho de entrecruzamiento (J. G. K. Williams, 1988). Este proceso de transformación parece ser general entre las cianobacterias habiéndose descrito el mismo proceso para *Synechococcus* PCC 7942 (Williams y Szalay, 1983). Igual proceso de transformación ha sido descrito en el género *Bacillus*, donde la entrada de ADN en la célula conlleva también su linealización.

Como se aprecia en la Figura 33, el plásmido pKW1188 permite la integración en el cromosoma de ADN foráneo al estar flanqueado por ADN cromosómico de *Synechocystis*. La integración tiene lugar además en una zona dispensable del cromosoma, como se ha comprobado por la integración en ella del gen *kan*, que confiere resistencia a kanamicina, sin que se aprecie ninguna alteración, aparte de la resistencia al antibiótico, en el fenotipo de esta estirpe respecto al del silvestre. A partir de este plásmido hemos construido el plásmido pCSA6 el cual presenta, insertado en el sitio de restricción *Pst*I de pKW1188, un fragmento de 7 Kb de ADN de *Anabaena* PCC 7120 que contiene el gen *glnA* (ver Figura 33). Un dato a reseñar es la menor frecuencia de resistentes a kanamicina obtenidos con el plásmido pCSA6 (3×10^{-4} transformantes / viables) que con el plásmido pKW1188 (2×10^{-3}), estos datos concuerdan con el estudio realizado en *Synechococcus* PCC 7942 por Kolowsky *et al* (1984), los cuales han demostrado que la probabilidad de conseguir resistentes a un antibiótico cuyo gen se inserta en un fragmento de ADN genómico disminuye a la mitad por cada aumento en 2-3 Kb en la longitud del ADN foráneo insertado.

Los análisis realizados en la estirpe AM 6 demuestran que posee integrado de forma estable el gen *glnA* de *Anabaena* (ver apartado III. F. 3.). La primera



característica interesante que puede observarse en esta estirpe es su menor actividad GS, aproximadamente un 50 % inferior, respecto a la determinada en la estirpe silvestre. Como se puede apreciar en la Tabla 13, esta menor actividad se detecta a lo largo de las distintas fases de crecimiento.

Esta pérdida de actividad no puede ser atribuida a la integración *per se* de un fragmento de ADN foráneo en esa región del cromosoma de *Synechocystis*, ya que, como se ha comentado anteriormente, la integración del gen *kan* no provoca ninguna alteración en los niveles de actividad GS del transformante. Una posible explicación sería la existencia en el fragmento de ADN de *Anabaena* insertado en la estirpe transformante de un elemento que determinara un menor nivel de síntesis de GS. Recientemente, Yamashita *et al.* (1989) han realizado un completo y detallado estudio de la estructura molecular de las subunidades de la GS de *Salmonella*, describiendo las zonas de la cadena polipeptídica implicadas en la formación de los sitios activos de la enzima. De estos estudios se deduce que en la formación de un sitio activo intervienen restos de aminoácidos pertenecientes a dos subunidades adyacentes. A la luz de estos resultados podría pensarse que la menor actividad GS detectada en la estirpe transformante se debe a la existencia en ella de moléculas de enzima constituidas por subunidades procedentes de los dos genes *glnA*, lo cual podría determinar la formación de sitios activos no funcionales.

La disponibilidad del gen *glnA* de *Synechocystis* y la estirpe AM 6 hace posible el conseguir una estirpe de *Synechocystis* que presente como único gen *glnA* funcional el de *Anabaena*. Los estudios en dicha estirpe de la respuesta de la GS de *Anabaena* a la fuente de nitrógeno suministrada, tanto a nivel de actividad como de síntesis, puede ser de considerable interés para determinar donde radica

la diferencia que muestran estas dos cianobacterias respecto a la regulación de la glutamina sintetasa.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Se ha purificado a homogeneidad la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803. La enzima pura presenta una actividad específica de 143 U/mg proteína y está compuesta por un sólo tipo de subunidad, de peso molecular 52 kDa.
- 2.- La actividad biosintética de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 es fuertemente dependiente de Mg^{2+} , y se ve inhibida por ADP y AMP principalmente.
- 3.- Los estudios inmunológicos de las glutamina sintetetas de *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 6301 y *Calothrix* PCC 7601, demuestran el alto grado de conservación de esta enzima dentro del grupo de las cianobacterias.
- 4.- La actividad glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 se encuentra regulada por la fuente de nitrógeno disponible, encontrándose la enzima totalmente activa cuando la fuente de nitrógeno es nitrato e inactiva en un 90% cuando dicha fuente es amonio. El control de esta regulación parece estar ejercido por el balance entre la concentración intracelular de compuestos carbono-nitrogenados frente a compuestos carbonados. Proponemos que este control puede ser ejercido por el balance intracelular de glutamina y α -cetoglutarato.
- 5.- La regulación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* PCC 6803 se lleva a cabo también a nivel de síntesis de la proteína, siendo los niveles de proteína GS cuando la fuente de nitrógeno es nitrato el doble que cuando la fuente es amonio.

- 6.- La pérdida de actividad glutamina sintetasa mediada por amonio no parece ser debida a la modificación covalente de la enzima. Proponemos que dicha inactivación está provocada por la unión no covalente a la glutamina sintetasa de un compuesto fosforilado.

- 7.- Se ha clonado el gen estructural de la glutamina sintetasa, *glnA*, de *Synechocystis* PCC 6803 mediante hibridación heteróloga con un fragmento del gen *glnA* de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120. El gen complementa la auxotrofia de glutamina de un mutante de *Escherichia coli* carente de actividad glutamina sintetasa.

- 8.- Se ha obtenido una estirpe derivada de *Synechocystis* PCC 6803, estirpe AM6, que presenta incorporado en su cromosoma el gen *glnA* de *Anabaena* PCC 7120. Esta estirpe presenta un 50 % menos de actividad glutamina sintetasa que la estirpe silvestre.

VI BIBLIOGRAFIA

1. - Allen, M. B. and D. I. Arnon. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. Plant Physiol. 30 : 366-372
2. - Allen, M. M. 1968. Simple condition for the growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. 4 : 1-4
3. - Almassy, R. J., C. A. Janson, R. Hamlin, N. -H. Xuong and D. Eisenberg. 1986. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. Nature (London) 323 : 304-309.
4. - Arnon, D. I., B. D. McSwain, H. Y. Tsujimoto and K. Wada. 1974. Photochemical activity and components of membrane preparation from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. Biochem. Biophys. Acta 357 : 231-245.
5. - Ausubel, F. M., R. Brient, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Sthruhl. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. New York
6. - Bergmeyer, H. U. 1974. Methoden der enzymatischen analyse. 2^a ed. Verlag Chemie, Weinheim
7. - Bergmeyer, H. U., M. Grassl and H. E. Walter. 1983. Methods of enzymatic analysis. p. 126-328. Bergmeyer (ed.). Vol II. Third edition. Verlag Chemie, Weinheim.

8. - Bio-Rad protein assay. 1979. Instruction manual BIO-RAD Laboratories, Richmond, California.
9. - Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513.
10. - Blanco, F., A. Alaña, M. J. LLama and J. L. Serra. 1989. Purification and properties of glutamine synthetase from the non-N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum* . *J. Bacteriol.* 171 : 1158-1165.
11. - Bonen, L., W. F. Doolittle, and G. E. Fox. 1979. Cyanobacterial evolution : results of 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses. *Can. J. Biochem.* 57 : 879-888.
12. - Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254
13. - Brown, M. S., A. Segal and E. R. Stadtman. 1971. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the P_{II} - regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68 : 2949-2953.
14. - Caballero, F. J., F. J. Cejudo, F. J. Florencio, J. Cárdenas and F. Castillo. 1985. Molecular and regulatory properties of glutamine synthetase from the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. *J. Bacteriol.* 162 : 804-809.

15. - Castaño, J. G., A. Nieto and J. E. Feliu. 1979. Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 254 : 5576-5579.
16. - Chappelet-Tordo, D., M. Fosset, M. Iwatsubo, C. Gache and M. Lazdunski. 1974. Intestinal alkaline phosphatase. Catalytic properties and half of the sites reactivity. *Biochemistry* 13 : 1788-1795.
17. - Colombo, G. and J. J. Villafranca. 1986. Amino acid sequence of *Escherichia coli* glutamine synthetase from the DNA nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 261 : 10587-10591
18. - Denton, M. D. and A. Ginsburg. 1969. Conformational changes in glutamine synthetase from *Escherichia coli* . I. The binding of Mn^{2+} in relation to some aspects of the enzyme structure and activity. *Biochemistry.* 8 : 1714-1725.
19. - Deuel, T. F. and E. R. Stadtman. 1970. Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 245 : 5206-5213
20. - Deuel, T. F., Ginsburg, A., Yeh, J., Shelton, E. and E. R. Stadtman. 1970. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. Purification and physical characterization. *J. Biol. Chem.* 245 : 5195-5205.
21. - Dharmawardene, M. W. N., A. Haystead and W. D. P. Stewart. 1973. Glutamine synthetase of the nitrogen-fixing alga *Anabaena cylindrica* . *Arch. Mikrobiol.* 90 : 281-295.

22. - Dzelzkalns, V. A. and L. Bogorad. 1986. Stable transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 induced by UV irradiation. *J. Bacteriol.* 165 : 964-971.
23. - Elhai, J. and C. P. Wolk. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene.* 68 : 119-138.
24. - Ferguson, A. R. and A. P. Sims. 1974. The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis* : the inactivation of glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 80 : 173-185
25. - Ferguson, A. R. and A. P. Sims. 1974. The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis* : the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 80 : 159-171.
26. - Fisher, R., R. Tuli and R. Haselkorn. 1981. A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli* , but the enzyme is not adenylylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 3393-3397.
27. - Fisher, S. H. and L. V. Wray. 1989. Regulation of glutamine synthetase in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 171 : 2378-2383.
28. - Florencio, F. J. and J. L. Ramos. 1985. Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans* . *Biochim. Biophys. Acta.* 838 : 39-48.

29. - Florencio, F. J. and J. M. Vega. 1983. Separation, purification, and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Naturforsch. 38 : 531-538.
30. - Florencio, F. J., Marqués, S. and P. Candau. 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. FEBS Lett. 223 : 37-41.
31. - Flores, E., J. M. Romero, M. G. Guerrero, and M. Losada. 1983. Regulatory interactions of photosynthesis nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochem. Biophys. Acta 725 : 529-532.
32. - Flores, E., M. G. Guerrero and M. Losada. 1980. Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. Arch. Microbiol. 128 : 137-144.
33. - Ginsburg, A., J. Yeh, S. B. Henning and M. D. Denton. 1970. Some effects of adenylation on the biosynthetic properties from *Escherichia coli*. Biochemistry. 9 : 633-648.
34. - Grigorieva, G. and S. Shestakov. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. FEMS Microbiol. Lett. 13 : 367-370.

35. - Hachimori, A., A. Matsunaga, M. Shimizu, T. Samejima and Y. Nosoh. 1974. Purification and properties of glutamine synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 350 : 461-474
36. - Harrison, M. A., J. N. Keen, J. B. C. Findlay and J. F. Allen. 1990. Modification of a glnB-like gene product by photosynthetic electron transport in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Lett.* 264 : 25-28.
37. - Herdman, M., S. F., Delaney and N. G. Carr. 1973. A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 79 : 233-237.
38. - Hers, H. G. and E. Van Schaftingen. 1982. Fructose 2, 6 - bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206 : 1-12.
39. - Hunt, J. B., P. Z. Smyrniotis, A. Ginsburg and E. R. Stadtman. 1975. Metal ion requirement by glutamine synthetase of *Escherichia coli* in catalysis of γ -glutamyl transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* 166 : 102-124.
40. - Ihnlenfeldt, M. J. A., and J. Gibson. 1975. CO₂ fixation and its regulation in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Arch. Microbiol.* 102: 13-21
41. - Immunoprecipitation. 1982. In *Immunochemistry in practice*. p. 227-231. Alan Johnstone and Robin Thorpe (eds). Blackwell Scientific Publications.

42. - Ip, S. M., P. Rowell and W. D. P. Stewart. 1983. The role of specific cations in regulation of cyanobacterial glutamine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114 : 206-213.
43. - Iyer, R. K., R. Tuli and J. Thomas. 1981. Glutamine synthetase from rice : Purification and preliminary characterization of two forms in leaves and one form in roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 628-635.
44. - James, G. T. 1978. Inactivation of the protease inhibitor PMSF in buffers. *Anal. Biochem.* 86 : 574-579.
45. - Kerby, N. W., S. C. Musgrave, P. Rowell, S. V. Shestakov and W. D. P. Stewart. 1986. Photoproduction of ammonium by immobilized mutant strains of *Anabaena variabilis* . *Applied Microbiol. Biotechnol.* 24 : 42-46.
46. - Kingdon, H. S., Shapiro, B. M. and E. R. Stadtman. 1967. Regulation of glutamine synthetase, VIII. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58 : 1703-1710.
47. - Kolowsky, K. S., J. G. W. Williams and A. A. Szalay. 1984. Length of foreign DNA in chimeric plasmids determines the efficiency of its integration into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R-2. *Gene* 27 : 289-299
48. - Kustu, S., J. Hirschman, D. Burton, J. Jelesko and J. C. Meeks. 1984. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase : physiological significance. *Mol. Gen. Genet.* 197 : 309-317.



49. - Kustu, S., J. Hirschman, J. C. Meeks. 1985. Adenylation of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. P. 201-213. In S. Shaltiel and P. B. Chock, (eds). Current Topics in Cellular Regulation. Vol 27. Academic Press , Inc., New York.
50. - Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
51. - Lara, C., J. M. Romero and M. G. Guerrero. 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* . J. Bacteriol. 169 : 4376-4378.
52. - Laurell, C. B. and E. J. McKay. 1981. Electroimmunoassay. Methods Enzymol. 73 : 339-369.
53. - Lindroth, P. and K. Mopper. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. Anal. Biochem. 51 : 1667-1674.
54. - López-Ruiz, A., J. Díez, J. P. Verbelen and J. M. Roldán. 1989. Immunochemical localization of glutamine synthetase in unicellular and filamentous cyanobacteria. Plant Physiol. Biochem. 27 : 461-464.
55. - Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

56. - MacKinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140 : 315-322.
57. - Madueño, F., M. A. Vega-Palas, E. Flores and A. Herrero. 1988. A cytoplasmic-membrane protein repressible by ammonium in *Synechococcus* R2 : altered expression in nitrate-assimilation mutants *FEBS Lett.* 239 : 289-291
58. - Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16 : 135-168.
59. - Magasanik, B. 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem. Sci.* 13 : 475-479.
60. - Mangum, J. H., C. Magni and E. R. Stadtman. 1973. Regulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the P_{II} regulatory protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 158 : 514-525.
61. - Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
62. - Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber and N. E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87 : 206-210.

63. - Marqués, S., F. J. Florencio and P. Candau. 1989. Ammonia assimilating enzymes from cyanobacteria : *in situ* and *in vitro* assay using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 180 : 152-157.
64. - Martin, F., A. Suzuki and B. Hirel. 1982. A new high-performance liquid chromatography assay for glutamine synthetase and glutamate synthase in plant tissues. *Anal. Biochem.* 125 : 24-29.
65. - McMaster, B. J., M. S. Danton, T. A. Storch and V. L. Dunham. 1980. Regulation of glutamine synthetase in the blue-green alga *Anabaena flos-aquae* . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96 : 975-983.
66. - Meeks, J. C., Wolk, C. P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P. W. and Chien, W. S. 1978. Pathways of assimilation of [^{13}N] N_2 and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134 : 125-130.
67. - Meeks, J. C., Wolk, C. P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P. W., Austin, S. M., Chien, W. S. and Galonsky, A. 1977. The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* . *J. Biol. Chem.* 252 : 7894-7900.
68. - Mérida, A. L. Leurentop, P. Candau and F. J. Florencio. 1990. Purification and properties of glutamine synthetase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J. Bacteriol.* 172 :
69. - Meyer, J. M. and E. R. Stadtman. 1981. Glutamine synthetase of Pseudomonads : some biochemicals and physicochemical properties. *J. Bacteriol.* 146 : 705-712.

70. - Mifflin, B. J. and Lea, P. J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*. 15 : 873-885.
71. - Nagatani, H., Schimizu, M. and Valentine, R. C. 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen-fixing bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 79 : 164-175.
72. - Nakano, Y., Kato, C., Tanaka, E., Kimura, K and K. Horikoshi. 1989. Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene (*glnA*) and its upstream region from *Bacillus cereus*. *J. Biochem.* 106 : 209-215
73. - Nilsson, L. Å. 1983. Double diffusion in gel. p. 57-68. In N. H. Axelsen (ed.) *Handbook of immunoprecipitation in gel techniques*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
74. - Ohmori, M., Y. Satoh and K. Urata. 1989. Light-induced accumulation of lactate and succinate in *Anabaena cylindrica* . *Arch. Microbiol.* 151 : 101-104.
75. - Omata, T., M. Ohmori, N. Arai and T. Ogawa. 1989. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 6612-6616.
76. - Orr, J. and R. Haselkorn. 1981. Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 256 : 13099-13104.

77. - Orr, J. and R. Haselkorn. 1982. Regulation of glutamine synthetase and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* spp. J. Bacteriol. 152 : 626-635.
78. - Orr, J., L. M. Keefer, P. Keim, T. D. Nguyen, T. Wellems, R. L. Henrikson and R. Haselkorn. 1981. Purification, physical characterization, and NH₂-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. J. Biol. Chem. 256 : 13091-13098.
79. - Pearce, J., and N. G. Carr. 1967. An incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. Biochem. J. 105 :45.
80. - Penefsky, H. S. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252 : 2891-2899.
81. - Pinkus, L. M. 1977. Glutamine binding sites. Methods Enzymol. 46 : 414-427.
82. - Reitzer, L. J. and B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. p. 302-320. In F. C. Neidhardt (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* . Cellular and molecular biology. vol 1. American Society for Microbiology. Washington, DC.
83. - Riccardi, G., E. De Rosi, G. Della Valle and O. Ciferri. 1985. Cloning of the glutamine synthetase gene from *Spirulina platensis* . Plant Mol. Biol. 4 : 133-136

84. - Richter, G. 1961. The lack of diphosphofructose aldolase in two photosynthetic organisms, *Anacystis nidulans* and *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta. 48 : 606-608.
85. - Rippka, R. 1972. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 87 : 93-98.
86. - Rippka, R., J. Dervelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111 : 1-61.
87. - Romero, J. M., T. Coronil, C. Lara and M. G. Guerrero. 1987. Modulation of nitrate uptake in *Anacystis nidulans* by the balance between ammonium assimilation and CO₂ fixation. Arch. Biochem. Biophys. 256 : 578-584.
88. - Rosenberg, M. and D. A. Court. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Genet. 13 : 319-353.
89. - Rowell, P., M. J. A. M. Sampaio, J. K. Ladha and W. D. P. Stewart. 1979. Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity *in vivo* in response to light and NH₄⁺. Arch. Microbiol. 120 : 195-200
90. - Rowell, P., S. Enticott and W. D. P. Stewart. 1977. Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. New Phytol. 79 : 41-45.

91. - Sabularse, D. C. and R. L. Anderson. 1981. D-Fructose 2,6-bisphosphatase : a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in planta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103 : 848-855
92. - Sampaio, M. J. M. A., P. Rowell and W. D. P. Stewart. 1979. Purification and some properties of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and a *Nostoc* sp. *J. Gen. Microbiol.* 111 : 181-191.
93. - Sanangelantoni, A. M., D. Barbarini, G. Di Pasquale, P. Cammarano and O. Tiboni. 1990. Cloning and nucleotide sequence of an archaebacterial glutamine synthetase gene : phylogenetic implications. *Mol. Gen. Genet.* 221 : 187-194.
94. - Sawa, Y, H. Ochiai, K. Yoshida, K. Tanizawa, H. Tanaka and K. Soda. 1988. Glutamina synthetase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum* : Purification, characterization, and comparison with other cyanobacterial enzymas. *J. Biochem.* 104 : 917-923.
95. - Sawhney, S. K. and D. J. D. Nicholas. 1978. Effects of amino acids, adenine nucleotides and inorganic pyrophosphate on glutamine synthetase from *Anabaena cylindrica* . *Biochim. Biophys. Acta.* 527 : 485-496.
96. - Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes* : studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* 123 : 401-418.
97. - Shapiro, B. M. and E. R. Stadtman. 1970. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* 17 a : 910-922

98. - Sivak, M. N., C. Lara, J. M. Romero, R. Rodriguez and M. G. Guerrero. 1989. Relationship between a 47-kDa cytoplasmic membrane polypeptide and nitrate transport in *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 158 : 257-262
99. - Smith, A. J. 1973. Synthesis of metabolic intermediates. p. 39-65. In : Carr, N. G., Whitton, B. A. (eds). *The biology of blue-green algae*. Blackwell. London.
100. - Smith, A. J., J. London and R. Y. Stanier. 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* 94 : 972-983.
101. - Smith, R. G., G. C. Vanlerberghe, M. Stitt and D. H. Turpin. 1989. Short-term metabolite changes during transient ammonium assimilation by the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 91 : 749-755.
102. - Snustad, D. P., J. P. Hunsperger, B. M. Chereskin, and J. Messing. 1988. Maize glutamine synthetase cDNAs: isolation by direct genetic selection in *Escherichia coli*. *Genetics.* 120 : 1111-1124.
103. - Stacey, G., C. Van Baalen and F. R. Tabita. 1979. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria : regulation of glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 194 : 457-467

104. - Stacey, G., F. R. Tabita and C. Van Baalen. 1977. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria : purification of glutamine synthetase from *Anabaena* sp. strain CA. J. Bacteriol. 132 : 596-603.
105. - Stadtman, E. R. and A. Ginsburg. 1974. The glutamine synthetase of *Escherichia coli* : structure and control. p. 755-807. In P. Boyer (ed), *The Enzymes*, vol. 10, 3rd ed. Academic Press., Inc., New York.
106. - Stadtman, E. R. and P. B. Chock. 1978. Interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation. p. 53-92. In B. L. Horecker and E. R. Stadtman (eds), *Current Topics in Cellular Regulation*. Vol. 13, Academic Press., Inc., New York.
107. - Stanier, R. Y. and G. Cohen-Bazire. 1977. Photosynthetic prokaryotes : the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34 : 497-536.
108. - Stanier, R. Y. 1973. Autotrophy and heterotrophy in unicellular blue-green algae. In N. G. Carr and B. A. Whitton (eds). *The Biology of Blue-Green Algae*, Blackwell, Oxford, pp. 501-518.
109. - Stewart, W. D. P. 1980. Transport and utilization of nitrogen sources by algae. p. 577-607. In J. W. Payne (ed) *Microorganisms and Nitrogen Sources*. John Wiley. New York.
110. - Stewart, W. D. P., A. Haystead and M. W. N. Dharmawardene. 1975. Nitrogen assimilation and metabolism in blue-green algae. In W. D. P. Stewart (ed), *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms*. Cambridge University Press. pp. 129-158.

111. - Strauch, M. A., A. I. Aronson, S. W. Brown, H. J. Schreier and A. L. Sonenshein. 1988. Sequence of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene region. *Gene* 71 : 257-265.
112. - Streicher, S. L. and B. Tyler. 1981. Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the gram-positive bacterium *Streptomyces cattleya* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 229-233.
113. - Tandeau de Marsac, N. and J. Houmard. 1987. Advances in cyanobacterial molecular genetics. p. 251-302. In P. Fay and C. Van Baalen (eds), *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
114. - Tate, S. S., L. Fang - Yun and A. Meister. 1972. Rat liver glutamine synthetase. Preparation, properties and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 247 : 5312-5321.
115. - Thompson, S. T. and E. Stellwagen. 1976. Binding of Cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 : 361-365.
116. - Thompson, S. T., K. H. Cass and E. Stellwagen. 1975. Blue Dextran-Sepharose : an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 : 669-672
117. - Tuli, R. and J. Thomas. 1981. *In vivo* regulation of glutamine synthetase by ammonium in the cyanobacterium *Anabaena* L-31. *Arch. Biochem. Biophys.* 206 : 181-189.

118. - Tumer, N. E., S. J. Robinson and R. Haselkorn. 1983. Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* : 337-342.
119. - Vega-Palas, M. A., F. Madueño, A. Herrero and E. Flores. 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 172 : 643-647.
120. - Weathers, P. J. and, M. M. Allen. 1978. Variations in short term products of inorganic carbon fixation in exponential and stationary phase cultures of *Aphanocapsa* 6308. *Arch. Microbiol.* 116 : 231-234.
121. - Wedler, F. C. and F. M. Hoffmann. 1974. Glutamine synthetase of *Bacillus stearothermophilus* . I. Purification and basic properties. *Biochemistry.* 13 : 3207-3214.
122. - Weller, M. 1979. Protein Phosphorylation. The nature, function, and metabolism of proteins which contain covalently bound phosphorus. Piond Limited, London.
123. - Williams, J. G. K. 1988. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering. *Methods in Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* Vol 167. p.766-778
124. - Williams, J. G. W. and A. A. Szalay. 1983. Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R-2. *Gene* 24 : 37-51

125. - Wolk, C. P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* 37 : 32-101.
126. - Wolk, C. P., Thomas, J., Shaffer, P. W., Austin, S. M. and Galonsky, A. 1976. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ^{13}N -labelled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251 : 5027-5034.
127. - Woolfolk, C. A. and E. R. Stadtman. 1964. Cumulative feedback inhibition in the multiple end product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17 : 313-319.
128. - Woolfolk, C. A. and E. R. Stadtman. 1967. Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 118 : 736-755.
129. - Woolfolk, C. A., Shapiro, B. and E. R. Stadtman. 1966. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 116 : 177-192.
130. - Wray, L. V. and S. H. Fisher. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptomyces coelicolor* gene encoding glutamine synthetase. *Gene.* 71 : 247-256.
131. - Yamashita, M. M., R. J. Almassy, C. A. Janson, D. Cascio and D. Eisenberg. 1989. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 264 : 17681-17690.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de

Angel Mérida Berlanga
La glutamina sintetasa de la cianobacteria unicelular
Synechocystis PCC 6803: Purificación, estudio de su regulación
por la fuente de nitrógeno y clonación del gen glnA.
UNANIMIDAD APTO CUM LAUDE POR

Sevilla, 9 de noviembre 1990

El Vocal,

Emilio Plm

El Presidente,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

Angel Mérida



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672476