



R. 4050

TD
606

ENZIMAS DE LA ASIMILACION DE AMONIO
EN LA BACTERIA *A. chroococcum*

Trabajo presentado para optar el grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado J. ANTONIO BARCENA RUIZ.

M. Nicena

Sevilla, Marzo de 1980

DIRECTOR

Dr. Antonio Paneque Guerrero
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

TS
606

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

7-3-80

ENTRADA N.º 93

A mis padres

A mis amigos de Sevilla

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla, que dirige el Prof. D. Manuel Losada Villante a quien agradezco el haberme dado cabida en su grupo de investigación.

Deseo expresar mi agradecimiento a D. Antonio Paneque, director de esta Tesis, por su comprensión y calidad humana siempre y por las enseñanzas recibidas de él.

Agradezco su amistad a Antonio Llobell, con quien he compartido los buenos y malos ratos que nos ha hecho pasar nuestro Azotobacter, y a José Moreno (Pepe) su ayuda técnica e interés por mis experimentos.

A Josefa Pérez de León (Pepa), que ha pasado a limpio las gráficas y mecanografiado el texto, le agradezco su dedicación desinteresada.

A los miembros del Departamento que se han interesado por la marcha de mi trabajo, les agradezco sus comentarios y sugerencias.

Quiero hacer constar aquí mi gratitud a todos los que han sido mis compañeros de laboratorio desde mi incorporación al mismo en Enero del 76, por su acogida y colaboración y, en especial, a los miembros de éste y otros departamentos que me han brindado su amistad y ayuda dentro y fuera de la Facultad.

Durante el periodo de realización de esta Tesis, el laboratorio ha recibido ayuda económica de la Universidad de Sevilla, del C.S.I.C., de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y de la National Science Foundation, U.S.A.

INDICE

Abreviaturas y símbolos	1
I. <u>INTRODUCCION</u>	4
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	16
A. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO	17
A.1. Material biológico	17
A.2. Condiciones estándar de cultivo	17
A.3. Modificaciones del medio estándar	18
A.4. Mantenimiento del organismo y preparación de los inóculos	18
A.5. Recogida de células	19
B. PREPARACION DE EXTRACTOS ACELULARES	19
B.1. Obtención del extracto crudo I	19
B.2. Obtención del extracto crudo II	20
C. ENSAYOS ENZIMATICOS	21
C.1. Ensayo de la actividad glutamato sintasa ...	21
C.1.1. <i>Ensayo de la actividad dependiente de NADPH</i>	21
C.1.2. <i>Ensayo de la actividad dependiente de di - tionito</i>	22
C.1.3. <i>Ensayo de la actividad dependiente de di - tionito y mediada por metil viológeno</i>	23
C.2. Ensayo de la actividad glutaminasa	23
C.3. Ensayo de la actividad glutamato deshidroge- nasa	23
C.3.1. <i>Aminación reductiva de α-cetoglutarato</i> ...	23
C.3.2. <i>Desaminación oxidativa de glutamato</i>	24
C.4. Ensayo de la actividad glutamina sintetasa .	24

D. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS .	25
D.1. Centrifugaciones	25
D.2. Cromatografía en columnas	26
D.2.1. <i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	26
D.2.2. <i>Cromatografía de filtración en gel</i>	26
D.2.3. <i>Cromatografía de afinidad en azul-sefarosa</i>	27
D.3. Electroforesis analítica en gel de poliacril amida	27
D.3.1. <i>Electroforesis a pH 8,3</i>	27
D.3.2. <i>Electroforesis en gel con SDS</i>	28
D.3.3. <i>Tinción de proteína en gel</i>	29
D.3.4. <i>Localización de la actividad glutamina sin</i> <i>tetasa en los geles</i>	29
D.3.5. <i>Localización de la actividad diaforasa en</i> <i>los geles</i>	29
D.4. Determinaciones espectrofotométricas	30
D.5. Determinación de proteína	30
D.6. Determinación de glutamato	30
D.7. Ensayos anaeróbicos	31
D.8. Desalinización	32
D.9. Medidas de pH	32
E. REACTIVOS	33
III. <u>RESULTADOS</u>	34
A. EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO CELULAR	35
B. LOCALIZACION DE LAS ACTIVIDADES GLUTAMATO SIN- TASA Y GLUTAMINA SINTETASA DE <i>A. chroococcum</i> .	38
C. GLUTAMINA SINTETASA. CONDICIONES OPTIMAS PARA SU PURIFICACION	38

C.1. Preparación de los extractos crudos	39
C.2. Tratamiento por calor	39
C.3. Precipitación fraccionada con sulfato amónico co	40
C.4. Filtración en gel	41
C.5. Cromatografía en DEAE-celulosa	41
C.6. Procedimiento alternativo	43
C.7. Electroforesis analítica	44
D. PURIFICACION DE LA GLUTAMATO SINTASA	45
D.1. Primera precipitación con sulfato amónico .	47
D.2. Cromatografía en DEAE-celulosa	48
D.3. Segunda precipitación con sulfato amónico .	48
D.4. Cromatografía en azul-sefarosa	50
D.4.1. <i>Pruebas preliminares</i>	50
D.4.2. <i>Procedimiento óptimo</i>	50
D.5. Inclusión de un paso de filtración en gel, en el proceso de purificación	51
D.6. Análisis electroforético de la fracción V.	51
D.7. Estabilidad	53
E. PROPIEDADES CINETICAS Y FISICOQUIMICAS DE LA GLUTAMATO SINTASA	54
E.1. Requerimiento de los sustratos	54
E.2. Correlación entre la concentración de enzi- ma y la actividad	57
E.3. Estequiometría de la reacción	57
E.4. Efecto de algunos aniones sobre la activi- dad	57

E.5. Influencia del pH	60
E.6. Parámetros cinéticos. Km para α -cetoglutarato, glutamina y NADPH	62
E.7. Espectro de absorción	66
F. IMPLICACION DE GRUPOS ESPECIFICOS EN EL PROCESO CATALITICO	68
F.1. Papel de la flavina unida a la enzima	68
F.2. Presencia de grupos sulfhidrilos funcionales	70
F.3. ¿Participación de hierro en la catálisis?..	73
G. REACCIONES SECUNDARIAS O PARCIALES CATALIZADAS POR LA GLUTAMATO SINTASA	74
G.1. Actividad glutaminasa. Caracterización y cinética	74
G.2. Glutamato sintasa dependiente de ditionito. Caracterización y cinética	79
G.3. Actividad glutamato deshidrogenasa	79
H. EFECTO DEL NADPH SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO SINTASA	80
H.1. Anomalías en el ensayo de la actividad	81
H.1.1. <i>Dependiendo del estado de la preparación enzimática</i>	81
H.1.2. <i>Dependiendo del orden de adición de los componentes</i>	81
H.2. Inactivación por NADPH	83
H.2.1. <i>Especificidad</i>	83
H.2.2. <i>Protección</i>	86
H.2.3. <i>¿Participación de radicales de oxígeno?</i> .	87
H.2.3.1. <i>Inactivación por H_2O_2</i>	89

H.2.3.2.	<i>Efecto de compuestos captadores de radicales de oxígeno y de la catalasa .</i>	89
H.2.3.3.	<i>Anaerobiosis</i>	90
H.2.4.	<i>Reversión</i>	92
H.2.5.	<i>Dependencia de la concentración de NADPH.</i>	94
H.2.6.	<i>Influencia del tiempo de incubación</i>	94
H.2.7.	<i>Influencia de la concentración de proteína</i>	95
H.2.8.	<i>Cinética</i>	97
IV.	<u>DISCUSION</u>	100
A.	"GS/GOGAT": UNICA RUTA PARA LA ASIMILACION DE AMONIO EN <i>A. chroococcum</i>	101
B.	GLUTAMINA SINTETASA: SOBRE SU PURIFICACION Y REGULACION	107
C.	GLUTAMATO SINTASA	109
C.1.	Sobre su purificación	109
C.2.	Sobre sus propiedades catalíticas, cinéticas y fisicoquímicas	113
V.	<u>CONCLUSIONES</u>	126
VI.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	129

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	absorbancia
Å	arngtrom
ADN	ácido desoxirribonucléico
ADP	adenosina-difosfato
AMP	adenosina-monofosfato
AOA	amino-oxi-acetato
ATP	adenosina-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
°C	grado centígrado
D	dalton
DEAE	dietilaminoetil
DO	densidad óptica
DTE	dietioeritritol
e ⁻	electrones
E' ₀	potencial redox estándar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FAD	flavín-adenín-dinucleótido
Fe-S	asociación de hierro-azufre
g	aceleración de la gravedad
GDH	glutamato deshidrogenasa
Glnasa	glutaminasa
Glutamato-Na	glutamato-monosódico
GS	glutamina sintetasa
GS-AMP	glutamina sintetasa adenilada
GSH	forma reducida del glutathion

GS(Mg ²⁺)	actividad transferasa dependiente de Mg ²⁺
GS(Mn ²⁺)	actividad transferasa dependiente de Mn ²⁺
GSSG	forma oxidada del glutatión
GUS	glutamato sintasa
h	hora
HEPES	hidroxietyl piperazina-etano - sulfonato
kD	kilodalton
α -KG	α -cetoglutarato
μ	fuerza iónica
mA	miliamperio
MES	2-(N-morfolino)-etanosulfonato
min	minuto
MOPS	2-(N-morfolino)-propano sulfonato
mU	miliunidades de actividad enzimática
MV	metilviológeno
MVH	metilviológeno reducido
Na-ADP	adenosina-difosfato, sal sódica
NAD ⁺	nicotinamida-adenín-dinucleótido, oxidado
NADH	nicotinamida-adenín-dinucleótido, reducido
NADP ⁺	nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato, <u>oxi</u> dado
NAD(P) ⁺	NAD ⁺ y NADP ⁺ , indistintamente
NADPH	nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato, re- ducido
NAD(P)H	NADH y NADPH, indistintamente
Nasa	nitrogenasa
nitro-BT	<i>p</i> -nitroazultetrazolio
nm	nanometro

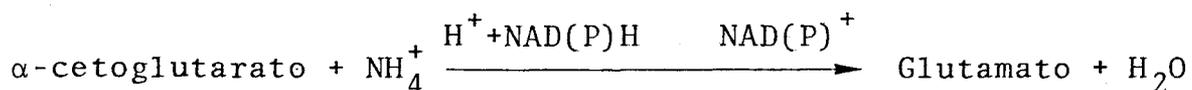
NO ₃ Rasa	nitrato reductasa
NO ₂ Rasa	nitrito reductasa
pHMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato
p/v	peso/volumen
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tricina	tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidad de actividad enzimática
v/v	volumen/volumen
∅	diámetro

I. INTRODUCCION

El amonio ocupa una posición crucial en el metabolismo de los microorganismos que crecen con fuentes de nitrógeno inorgánico: por un lado, la mayoría de estos microorganismos puede utilizarlo como fuente de nitrógeno y por otro, es el producto de la reducción del nitrógeno molecular y del nitrato. Además, en presencia de dinitrógeno o nitrato, el amonio es utilizado preferentemente y su presencia, en muchos casos, impide la reducción de aquellos compuestos.

Existen varias vías metabólicas que podrían ser utilizadas para la asimilación del amonio, en diferentes bacterias. Entre estas vías se encuentran las que implican la acción de la aspartasa o de deshidrogenasas de aminoácidos, y la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa.

Durante muchos años, se consideró que la primera y principal reacción consistía en la aminación reductiva del α -cetoglutarato, catalizada por la glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.3.):

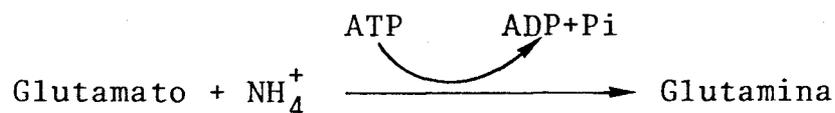


Está bien establecida la presencia de glutamato deshidrogenasa (GDH) en la mayoría de las bacterias y prácticamente en todos los organismos vivos; *in vitro*, la reacción catalizada por la GDH, está favorecida termodinámicamente hacia la síntesis de glutamato; además, ciertos estudios cinéti

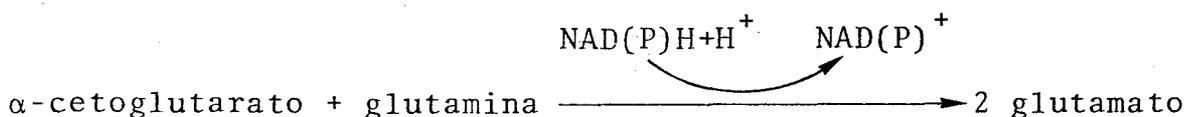
cos de marcaje isotópico con ^{15}N , en *Candida utilis* (Sims y Folkes, 1964) y, en *Chlorella* (Bassham y Kirk, 1964), fueron considerados concluyentes en favor de esta ruta de asimilación del amonio y por extrapolación, se hicieron extensivos a todos los microorganismos.

Sin embargo, debido principalmente a su elevada K_m para el amonio (por término medio $\sim 4 \text{ mM}$), varios investigadores comenzaron a considerar la existencia de otra vía metabólica, al menos cuando la concentración de amonio disponible es baja. De hecho, en *Klebsiella aerogenes* (Meers *et al.*, 1970), los niveles de GDH eran altos cuando el sustrato limitante era la fuente de carbono ó el fosfato, pero cuando el factor limitante era el amonio ($0,5 \text{ mM}$, es decir, más de 10 veces menor que la $K_m (\text{NH}_3)$ de la GDH), el nivel de GDH descendía hasta un 3% del original y no podía, por tanto, satisfacer las necesidades biosintéticas del organismo. Como *K. aerogenes* no sintetizaba aspartasa u otras deshidrogenasas de aminoácidos en esas condiciones, se supuso que debería haber algún otro sistema responsable de la asimilación de amonio. Tras una serie de experimentos a niveles fisiológico y enzimático, llegaron a la conclusión de que el amonio se fija en primer lugar a la glutamina seguido de la formación de glutamato. El primer paso de este proceso estaría catalizado por la glutamina sintetasa (GS) (E.C.6.3.1.2.), una enzima sobradamente conocida ya, que cataliza la siguiente

reacción:



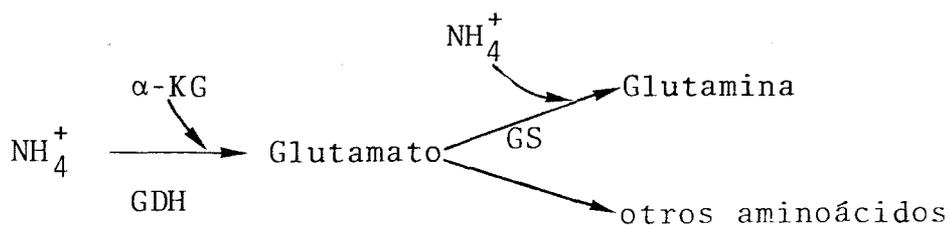
La segunda etapa sería la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina a la posición 2 del α -ceto - glutarato, catalizada por una enzima hasta entonces desconocida: la glutamato sintasa, (GUS) (E.C.2.6.1.53):



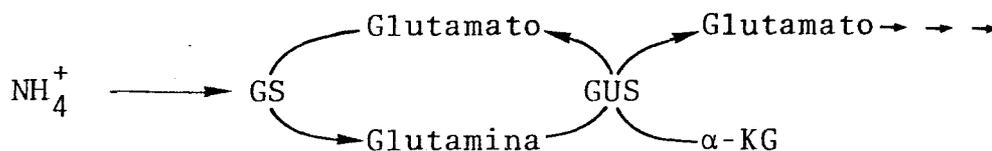
La actividad de esta enzima aumentaba cuando *K. aerogenes* era cultivado en nitrato, ó en amonio a bajas concentraciones, mientras que con la GDH ocurría lo contrario.

La ruta de incorporación de amonio que quedó establecida, en un principio para *K. aerogenes*, se puede resumir así:

a) concentración de NH_4^+ elevada:



b) concentración de NH_4^+ baja:



Desde los experimentos iniciales de Meers *et al.* (1970), se ha estudiado la ruta de incorporación de amonio en muchos otros organismos (bacterias, cianobacterias, algas, hongos y plantas superiores). La presencia de glutamato sintasa y el funcionamiento de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa (ó "GS/GOGAT") han sido demostrados en casi todos los organismos investigados, con la excepción de la mayoría de los hongos y levaduras (ver las revisiones de Brown *et al.*, 1974; Miflin y Lea, 1976 y Tyler, 1978). La glutamato deshidrogenasa (GDH) ha quedado relegada a un segundo plano.

Curiosamente, algunas bacterias carecen incluso de GDH detectable como por ejemplo, *Bacillus megaterium* MA22 (Elmerich y Aubert, 1971), *Rhodospseudomonas capsulata* (Johansson y Gest, 1976), *Rhizobium* 32H1 (Ludwig, 1978), *Caulobacter crescentus* (Ely *et al.*, 1978) y *A. chroococcum* (este trabajo).

La glutamina sintetasa es una enzima estudiada a fondo hace tiempo, a pesar de lo cual sigue siendo el objetivo de importantes investigaciones. Son dignos de destacar

los trabajos iniciales llevados a cabo por Stadtman en E.E.U.U. y Holzer en Alemania y sus colaboradores durante los años 60 y más recientemente los de Magasanik y cols. en E.E.U.U. (para revisión, ver las de Shpairo y Stadtman, 1970; Holzer y Duntze, 1971; Ginsburg y Stadtman, 1973; Magasanik *et al.*, 1974 y Magasanik, 1977).

Esta enzima cataliza la reacción irreversible mediante la cual se forma glutamina a partir de glutamato y amonio, en presencia de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y ATP. Está sometida a 3 niveles de regulación:

a) Control de su síntesis. En presencia de concentraciones elevadas de amonio, los niveles de GS son bajos en *E. coli*, *B. subtilis*, *Lactobacillus arabinosus*, varias *pseudomonas* y *K. aerogenes*, lo que se ha relacionado con una represión de la síntesis provocada por el amonio (y por algunos aminoácidos), y en parte también con una modificación química que produce la inactivación de la enzima, como se verá a continuación.

b) Retroinhibición por productos finales del metabolismo de la glutamina. Este es un aspecto complicado, ya que cada metabolito sólo produce inhibición parcial, siendo acumulativos los efectos inhibidores individuales. Este aspecto ha sido discutido detalladamente por Stadtman (1970).

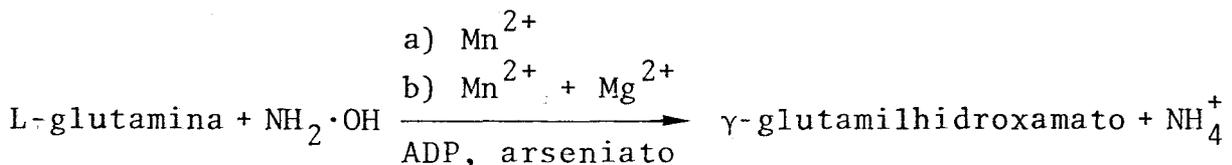
c) Modificación química de su estructura, que afecta de forma sutil a la actividad enzimática. La enzima es

interconvertible entre dos formas: una desadenilada, activa y otra adenilada (GS-AMP), menos activa. La conversión de una forma en otra está catalizada por, al menos, dos enzimas que a su vez son sensibles a varios metabolitos del metabolismo de los compuestos nitrogenados (α -cetoglutarato y glutamina) y al ATP y AMP (al "estado energético" de la célula).

Se sabe que cada una de las 12 subunidades que componen la GS, puede unirse a un grupo adenilo. A medida que el oligómero va adenilándose, hasta un máximo de 12, la actividad en presencia de Mg^{2+} disminuye hasta cero, mientras que la actividad con Mn^{2+} aumenta.

Actualmente parece ser aceptada la idea de que todas las bacterias Gram-negativas poseen una glutamina sintetasa interconvertible, mientras que las Gram-positivas, no (Tronick *et al.*, 1973).

La enzima se puede ensayar *in vitro* mediante reacciones no fisiológicas, entre ellas la que se conoce como actividad "transferasa":



En presencia de Mn^{2+} , 0,3 mM (a), tanto la enzima adenilada (biosintéticamente inactiva) como la desadenilada

(fisiológicamente activa) cataliza esta reacción, mientras que en presencia de Mn^{2+} , 0,3 mM y Mg^{2+} , 60 mM (b), sólo la enzima desadenilada es funcional en este ensayo artificial (Stadtman *et al.*, 1970). Esta propiedad se suele utilizar para medir el estado de adenilación de la enzima (\bar{n}):

$$\bar{n} = 12 - 12 \frac{(b)}{(a)}$$

\bar{n} puede variar entre 0 y 12 moles de 5'-adenilo por mol de enzima.

Un aspecto importante de la GS, que la coloca en un lugar destacado dentro del metabolismo de los compuestos nitrogenados, es que la enzima, como tal, interacciona con el ADN activando la transcripción de varios genes que codifican la síntesis de enzimas implicadas en las rutas metabólicas de incorporación de nitrógeno en forma de glutamato y glutamina (Magasanik, 1977). Además, parece ser que la síntesis de glutamina sintetasa está autorregulada por la propia enzima.

La glutamato sintasa ("GOGAT" o "GUS") se ha purificado hasta homogeneidad a partir de *E. coli* (Mantsala y Zalkin, 1976; Miller y Stadtman, 1972 y Trotta *et al.*, 1974), *K. aerogenes* (Geary y Meister, 1977 y Trotta *et al.*, 1974), *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mantsala, 1978), de la fracción citoplásmica de la planta en nódulos de *Lupinus angustifolius* (Boland y Benny, 1977) y de cultivos de células de so-

ja (Chiu y Shargool, 1979). En todos los casos se ha comprobado que la enzima contiene flavina y en el caso de *E. coli* y *K. aerogenes*, además se ha comprobado la presencia de hierro y sulfuro lábil. En estos dos casos, se ha demostrado también que la enzima es un dímero constituido por dos subunidades distintas; la subunidad pequeña tiene el mismo peso molecular en ambas bacterias (alrededor de 50 kD) pero la subunidad grande de *K. aerogenes* es mayor (175 kD) que la de *E. coli* (135 kD). La composición en subunidades no está clara: Miller y Stadtman (1972) han comunicado que la enzima purificada de *E. coli* tiene un peso molecular de 800 kD indicando la asociación de 4 dímeros, mientras que Trotta *et al.* (1974) encontraron actividad completa en un sólo dímero aislado de *K. aerogenes*.

La enzima de nódulos de *Lupinus* (Boland y Benny, 1977) difiere de la de bacterias en que utiliza NADH en vez de NADPH y en que consiste en una sólo cadena polipeptídica de peso molecular 235 kD (probablemente erróneo, ya que es demasiado alto para un sólo polipéptido).

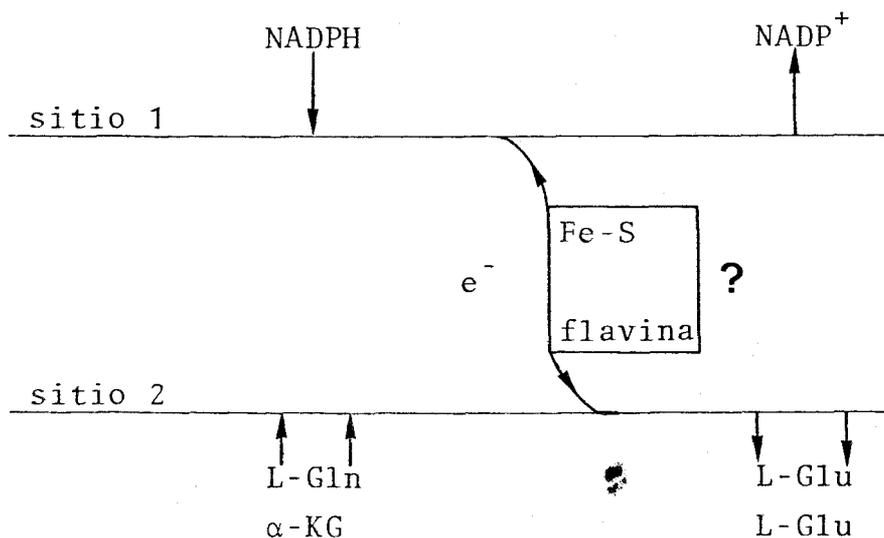
En plantas y algas verdes existe glutamato sintasa no caracterizada en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas. En unos casos, el donador de electrones es la ferredoxina (Mifflin y Lea, 1975 y Arima, 1978) y en otros NAD(P)H (Doughall, 1974; Chiu y Shargool, 1979). Ciertamente, no es fácilmente explicable la utilización de ferredoxina por una enzima de raíces de plantas.

Anderson y Done (1977) han descrito una glutamato sintasa de cloroplastos de *Pisum sativum*, al parecer acoplada al aparato fotosintético.

En hongos y levaduras sólo en contados casos se ha encontrado actividad glutamato sintasa (Roon *et al.*, 1974).

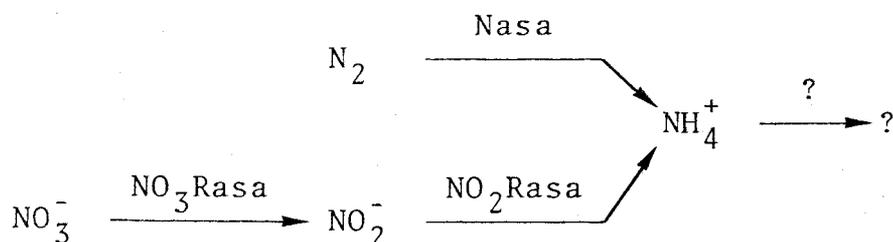
La regulación de la glutamato sintasa no está nada clara y según Tyler (1978) es necesario saber más sobre la naturaleza del control de esta enzima para resolver numerosos puntos oscuros en el metabolismo del nitrógeno.

En cuanto al mecanismo cinético de la reacción catalizada por la glutamato sintasa, existen hasta la fecha, sólo dos estudios: uno con la enzima de *Lupinus* (Boland, 1979) en que el autor postula la existencia de un mecanismo cinético "parcialmente al azar", y otro con la enzima de *E. coli* W (Rendina y Orme-Johnson, 1978), en que se propone un mecanismo "de dos sitios ping-pong bi-bi uni-uni", esquematizado en la figura siguiente, reproducida del mencionado trabajo:



Según estos autores, un mecanismo ping-pong de 2 sitios, supone la existencia de dos funciones distintas en la glutamato sintasa: una de almacenamiento de electrones, y otra de aminación reductiva. Los dos cofactores adicionales (Fe-S y flavina) actuarían como tampones redox frente a la entrada de electrones, según lo cual la enzima reaccionaría de forma no líneal ante el potencial redox celular. El desacoplamiento entre la entrada de electrones y la aminación reductiva facilitaría una propiedad reguladora de este tipo.

El objetivo de este trabajo ha sido elucidar el mecanismo fisiológico para la asimilación del amonio en *A. chroococcum*, mediante el estudio de las enzimas implicadas en el proceso. Se juzgó importante este estudio, porque los trabajos sobre el metabolismo del nitrógeno en este organismo fijador de dinitrógeno, se habían centrado únicamente en las primeras etapas, es decir, en las reacciones catalizadas por las enzimas, Nitrogenasa (Yates y Daniel, 1970; Yates y Planqué, 1975 y Robson, 1979); nitrato reductasa (Guerrero *et al.*, 1973; Guerrero y Vega, 1975; Tortolero *et al.*, 1975 y Vila *et al.*, 1978) y nitrito reductasa (Guerrero, Tesis doctoral y Vega *et al.*, 1975).



Lo que ocurre más allá del amonio quedaba por estudiar, siendo la glutamina sintetasa una enzima que, como que dó dicho anteriormente, juega un papel central en el metabolismo de los compuestos nitrogenados y estando consolidándose la idea de que la ruta "GS/GOGAT" es la principal vía de incorporación del NH_3 en esqueletos carbonados.

Drozd *et al.* (1972) se limitaron a medir los niveles de GDH y GUS en extractos crudos de *A. chroococcum*, sin profundizar en absoluto en el tema y sin dejar la cuestión a-clarada.

En los experimentos que se presentan en esta Tesis se demuestra la ausencia de GDH en *A. chroococcum* cuando esta bacteria crece con distintas fuentes de nitrógeno y la presen-cia, en todos los casos, de glutamato sintasa y glutamina sin-tetasa. Se discute la regulación de estas enzimas.

En los estudios enzimáticos se ha profundizado más en lo que respecta a la glutamato sintasa que a la GS, por presentar aquélla aspectos más atractivos, dado el escaso cono-cimiento que de ella se tiene y sus características cinéticas y catalíticas tan peculiares y complejas. Se describe la inac-tivación de dicha enzima con NADPH en un proceso no descrito hasta ahora y se discute la participación de distintos grupos (hierro, flavina, -SH) en la reacción catalítica. Se han pues-to a punto métodos óptimos para la purificación de ambas enzi-mas.

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

II.A.1. Material biológico

El organismo utilizado en el trabajo que aquí se presenta, ha sido la bacteria fijadora de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum*, A.T.C.C. 4412, procedente de la colección de cultivos tipo de la Universidad de Bilbao (Prof. F. Uruburu).

II.A.2. Condiciones estándar de cultivo

Las células se cultivaron aeróbicamente en condiciones estériles, utilizando matraces Erlenmeyer llenados con medio sintético hasta la mitad de su capacidad total, a 27°C, en un incubador orbital NEW BRUNSWICK modelo G-25, que suministraba a los cultivos una agitación constante de 180-200 r.p.m.

Un litro de medio contenía en milimoles: KNO_3 , 8; EDTA, 0,024; MgSO_4 , 0,8; NaCl, 3,4; CaCl_2 , 0,34; Na_2MoO_4 , 0,012; FeSO_4 , 0,18; Manitol, 27,5 y tampón fosfato potásico, pH 7,5, 20.

Los matraces, conteniendo el medio completo, a excepción del fosfato, y tapados con algodón graso, se esterilizaron en un autoclave eléctrico SELECTA modelo P, a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 min. Una solución de fosfato potásico, 0,5 M pH 7,5, repartida en pequeños volúmenes, se esterilizaba aparte para evitar su precipitación en forma de sal férrica; una vez fría, se vertía un volumen adecuado (40

ml por litro de medio) sobre el medio de cultivo, en condiciones estériles. Cuando el medio tenía glutamato, éste también se esterilizaba separadamente.

II.A.3. Modificaciones del medio estándar

Las variaciones introducidas en la composición del medio estándar descrito en el apartado anterior, afectan únicamente a la fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó dinitrógeno, se omitió el nitrato. En los experimentos de crecimiento con amonio como fuente de nitrógeno, se empleó acetato amónico a concentraciones variables, que se especifican en cada caso. Cuando el medio tenía glutamato como fuente de nitrógeno, la concentración de Manitol era 11 mM, en vez de 27,5 mM.

II.A.4. Mantenimiento del organismo y preparación de los inóculos

Para conservar las células, éstas se sembraban en tubos con medio sólido de igual composición que el medio descrito en II.A.2., pero con dinitrógeno como fuente de nitrógeno, y suplementado con agar al 2,5% (p/v), a 27°C; tras 2 días de crecimiento se colocaban en frío (0-4°C).

Para preparar los inóculos, se colocaba un tubo con células en medio sólido, a temperatura ambiente, durante 1-2 horas; se tomaba, en condiciones estériles, una cierta masa de células que se suspendía en 100 ml de medio líquido con la fuente de nitrógeno deseada y se dejaba crecer (1-2 días).

Con 10 ml de este cultivo se inoculaban 250 ml de medio fresco y antes de que las células alcanzaran la fase estacionaria de crecimiento (13 horas), se utilizaban como inóculo de partida, añadiendo 2-2,5 volúmenes de esta suspensión por cada 100 volúmenes de medio.

II.A.5. Recogida de células

Las células se recogieron en la fase final del crecimiento exponencial (unas 13 horas después de la inoculación) por centrifugación a 8.000 x *g* durante 10 min, en una centrifuga SORVALL, modelo RC2-B. Después de lavarlas con tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5, se volvían a centrifugar a 12.000 x *g*, 10 min y la pasta de células así obtenida se utilizaba inmediatamente para preparar los extractos acelulares.

El rendimiento de los cultivos estándar era de 2,5-3 g de "peso húmedo" por litro de medio en 13 horas de crecimiento.

II.B. PREPARACION DE EXTRACTOS ACELULARES

Para la obtención de extractos crudos se han seguido dos procedimientos distintos:

II.B.1. Obtención del extracto crudo I

Las células recogidas como se indica en II.A.5. se suspendían en tampón MES-KOH, 0,25 M, pH 6,6 + DTE, 0,5 mM, en proporción de 10 ml de tampón por gramo de peso húmedo de

células. (Esta proporción no puede ser menor, ni la concentración de tampón más baja, debido a que al romper las células se produce una gran liberación de protones. Con todo, en estas condiciones, el pH del extracto crudo, dos horas después de la rotura de las células, solía descender unas décimas, y se tenía que reajustar mediante la adición de unas gotas de una solución concentrada de KOH).

La suspensión de células, a 0-4°C, se sometía a tratamiento con ultrasonidos durante 4 min, en dos periodos de 2 min con un intervalo de 3 min de interrupción, manteniendo el recipiente sumergido en agua a 0°C. El aparato utilizado era un sonicador BRANSON, modelo B 12 de 20 kilociclos a 70 watos de potencia.

A continuación se centrifugaba la suspensión así tratada a 30.000 x g, 20 min, y el sobrenadante constituía el "extracto crudo I".

II.B.2. Obtención del extracto crudo II

Las células se suspendían en tampón MOPS-KOH, 0,25 M, pH 7,5 + DTE, 0,5 mM + Deoxicolato, 1% (p/v) en la misma proporción que en el procedimiento mencionado antes y se sometía a idéntico tratamiento con ultrasonidos. A continuación, se dejaba a temperatura ambiente durante 45-60 min, con agitación suave y constante. Seguidamente se centrifugaba a 30.000 x g, 30-45 min, y el sobrenadante constituía el "extracto crudo II". Esta preparación presentaba un aspecto muy viscoso,

especialmente después de mantenerla en frío durante 24 horas, por lo que se tomaban las debidas precauciones para evitar errores en las medidas de volumen. La viscosidad disminuía al poner la preparación a temperatura ambiente unos minutos.

II.C. ENSAYOS ENZIMATICOS

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

II.C.1.1. *Ensayo de la actividad dependiente de NADPH*

Se llevó a cabo según el método descrito por Meers *et al.* (1970), con modificaciones. La reacción se siguió espectrofotométricamente registrando continuamente el descenso de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación de NADPH. En algunas ocasiones la cinética no era lineal, en cuyo caso se calculaba la velocidad inicial trazando la tangente desde el origen. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: Tampón MOPS-KOH, pH 7,5, 100 μ moles; α -cetoglutaratato (ajustado a pH 7,5 con KOH), 5 μ moles; glutamina, 10 μ moles; NADPH, 0,12 μ moles y la suficiente cantidad de enzima para producir un descenso en la absorbancia de 0,05-0,15 en un minuto. La reacción se iniciaba por adición de la enzima.

En un ensayo previo, se determinaba la actividad NADPH oxidasa, eliminando de la mezcla de reacción la glutamina, y se restaba de la actividad total.

Una unidad de actividad enzimática se definía como

la cantidad de enzima que oxidaba 1 μmol de NADPH por minuto.

II.C.1.2. *Ensayo de la actividad dependiente de ditionito*

Se siguió el método de Mifflin y Lea (1975), para la enzima de plantas, con algunas modificaciones. El ensayo se llevaba a cabo en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml, los siguientes compuestos, en μmoles : MOPS-KOH, pH 7,5, 100; α -cetoglutarato (pH 7,5 con KOH), 5; glutamina, 10; amino-oxiacetato, 5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0,8 mg disueltos en 0,1 ml de tampón MOPS-KOH, 50 mM pH 7,5, y una cantidad apropiada de enzima.

La solución de ditionito se preparaba inmediatamente antes de ser utilizada.

La reacción se iniciaba con la adición de ditionito y se dejaba transcurrir, a 30°C, durante 30 min, tiempo durante el cual la velocidad se mantenía constante, parándola mediante agitación vigorosa durante medio minuto, para oxidar rápidamente el ditionito remanente; seguidamente se calentaba en un baño de agua hirviendo, durante 5 min; se centrifugaba a 700 x g durante 10 min y se determinaba enzimáticamente el glutamato formado (II.D.6.), en una fracción alícuota del sobrenadante.

El amino-oxiacetato es un inhibidor específico de las transaminasas. Su adición a la mezcla de ensayo evita la desaparición por transaminación del glutamato formado ó la

formación de más glutamato, al margen de la acción de la enzi ma sometida a estudio (Miflin y Lea, 1975).

II.C.1.3. *Ensayo de la actividad dependiente de ditionito y mediada por metil viológeno*

Se procedía igual que en II.C.1.2., pero añadiendo 0,15 μ moles de metil viológeno.

II.C.2. Ensayo de la actividad glutaminasa

Está basado en el método descrito por Trotta *et al.* (1974). Se procedía igual que en II.C.1.2., pero omitiendo de la mezcla de reacción el ditionito y el α -cetoglutarato. La reacción se detenía por calentamiento, a 100°C en un baño de agua hirviendo, durante 5 min, sin agitación previa.

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

Cuando se intentaba localizar esta actividad, se seguía la variación de la absorbancia a 340 nm, tanto para seguir la oxidación de NAD(P)H (aminación reductiva de α -cetoglutarato) como la reducción de NAD(P)⁺ (desaminación oxidativa de glutamato), esta última a dos pH diferentes: 7,5 y 9,0.

II.C.3.1. *Aminación reductiva de α -cetoglutarato*

Es una modificación del método descrito por Prusiner

et al. (1972). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml, los siguientes compuestos, en μ moles: MOPS-KOH, pH 7,5, 100; α -cetoglutarato, 5; NH_4Cl , 50; NAD(P)H, 0,15 y enzima en cantidad apropiada.

Antes se determinaba, en ensayo separado, la actividad NAD(P)H oxidasa eliminando el NH_4Cl de la mezcla de reacción.

II.C.3.2. *Desaminación oxidativa de glutamato*

Se procedía de la misma forma que Trotta *et al.* (1974), variando ligeramente algunas condiciones. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml, lo siguiente en μ moles: MOPS-KOH, pH 7,5, 100 (ó bien glicina-hidrazina, pH 9,0,200); glutamato monosódico, 50; NAD(P)^+ , 0,15 y una cantidad adecuada de enzima.

En extractos crudos procedentes de células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, existía una actividad NAD^+ -reductasa, que se medía separadamente eliminando de la mezcla el glutamato.

II.C.4. Ensayo de la actividad glutamina sintetasa

Se determinó colorimétricamente la actividad "transferasa" (Shapiro y Stadtman, 1970) mediante el procedimiento de Kleiner (1975) ligeramente modificado. La reacción se llevaba a cabo en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad, en un volumen de 1 ml conteniendo lo siguiente, en μ moles: MOPS-KOH,

pH 7,5, 100; glutamina, 25; Na-ADP, 0,5; $MnCl_2$, 0,3; $NH_2OH-HCl$, 25; Na_2HAsO_4 , 25; enzima, una cantidad apropiada. Cuando se medía la actividad dependiente de Mg^{2+} , se añadían 60 μ moles de $MgCl_2$. Se incubaba a 30°C durante 10 min y se paraba la reacción por adición de 2 ml de la siguiente mezcla: Acido Tricloroacético al 24%/HCl, 6 N/ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (10%) en HCl 0,02 N, en proporción 1/1/1. A continuación se centrifugaba para eliminar la turbidez que produce la proteína precipitada y se medía la absorbancia a 500 nm.

Se utilizó γ -glutamihidroxamato auténtico como patrón.

Siempre se hacía un ensayo control en el que se omitían el ADP y el Na_2HAsO_4 para corregir la formación posible de γ -glutamihidroxamato mediante reacciones distintas de la catalizada por la glutamina sintetasa. En general, este control daba valores muy bajos.

Una unidad de actividad enzimática, se definía como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de γ -glutamihidroxamato por minuto.

II.D. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

II.D.1. Centrifugaciones

Durante el proceso de purificación se emplearon centrifugas refrigeradas SORVALL modelo RC2-B con rotores apropiados según el volumen a centrifugar.

Para centrifugaciones a valores superiores a 30.000 x g, se utilizaron ultracentrífugas BECKMAN SPINCO modelos L2-50B y L2-65B y SORVALL modelo OTD-2 con rotores de ángulo fijo adecuados al volumen de la preparación.

II.D.2. Cromatografía en columnas

Todas las cromatografías se realizaban a una temperatura de 0-4°C.

II.D.2.1. *Cromatografía de intercambio iónico*

Se utilizaron columnas de vidrio de diferentes dimensiones, provistas de una placa porosa, suministradas por ANORSA. Antes de empaquetar el intercambiador (DEAE-celulosa, MERCK) se cubría la placa con una fina capa de arena purificada con ácido y calcinada (MERCK), para evitar la obstrucción de los poros. El empaquetamiento se realizaba mediante presión hidrostática, así como el proceso de equilibrado. La adsorción de la muestra se realizaba manteniendo el flujo constante con una bomba peristáltica LKB tipo Perpex 10.200, y la elución del mismo modo, pero reduciendo el flujo.

Las fracciones se recogían automáticamente con un colector LKB, mod. ULTRORAC 7000.

II.D.2.2. *Cromatografía de filtración en gel*

Se han utilizado los siguientes geles: Sephadex G-25 y G-200 (PHARMACIA), Bio-Gel A-1,5 m (BIO-RAD) y Ultrogel

AcA 44 (LKB), que se preparaban y utilizaban siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las columnas empleadas eran suministradas por PHARMACIA. El mantenimiento de flujo constante y la recogida de fracciones, como en II.D.2.1.

II.D.2.3. *Cromatografía de afinidad en Azul-Sefarosa*

Se ha utilizado gel "Reactive Blue-2-Sepharose Cl-6B" (SIGMA). El gel se empaquetaba en pequeñas columnas fabricadas con tubos de los utilizados en la electroforesis de gel de poliacrilamida (80 x 7 mm Ø), uno de cuyos extremos se tapaba con una membrana de nylon que dejaba pasar las proteínas pero retenía las bolas de gel. El volumen ocupado por el gel hinchado era de 2-2,5 ml. Cuando se realizaba la cromatografía de afinidad con fines preparativos, las dimensiones de la columna eran 100 x 16 mm Ø, con un volumen de gel de 12-15 ml. Después de utilizado el gel, se pasaba un volumen 5 veces superior al suyo propio, de una solución de KCl, 3 M + Urea, 6 M; a continuación se equilibraba en el tampón deseado y se volvía a utilizar.

El mantenimiento del flujo y la recogida de fracciones, como en II.D.2.1.

II.D.3. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida

II.D.3.1. *Electroforesis a pH 8,3*

Se procedió según el método de electroforesis en gel discontinuo descrito por Jovin *et al.* (1964), pero suprimien-

do el gel superior. Las separaciones se realizaron a 4°C en tubos de 100 x 5 mm Ø, con geles de poliacrilamida al 5 ó 7,5% y pH 8,3 utilizando tampón Tris-HCl en los geles, conteniendo TEMED al 0,46% (v/v), y tampón Tris-Glicina, 40 mM pH 8,3 como electrolito. La muestra (10-50 µg) contenía sacarosa al 20% (p/v) y azul bromofenol al 0,05% (p/v), éste último para visualizar el frente electroforético. El proceso se iniciaba aplicando una corriente continua de intensidad constante a 1,5 mA/tubo durante 15 min y luego de 3 mA/tubo hasta que el colorante marcador alcanzaba el extremo inferior (ánodo).

II.D.3.2. *Electroforesis en gel con SDS*

Se realizó a temperatura ambiente en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), preparados a pH 7,0 con tampón fosfato sódico, 0,2 M, en presencia de SDS, al 0,1% (p/v) y TEMED al 0,15% (v/v), según el método descrito por Weber y Osborn (1969). Tampón electrolito: fosfato sódico, 0,1 M pH 7,2 + SDS, 0,1% (p/v).

La muestra se calentaba en un baño de agua hirviendo durante 3-5 min en presencia de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, SDS, 10% (p/v), β-mercaptoetanol, 10% (v/v) y sacarosa (20%), luego se añadía azul bromofenol (0,05%). La electroforesis se iniciaba con una intensidad de 4 mA/tubo durante 30 min y luego 8 mA/tubo hasta que el marcador alcanzaba el extremo inferior del gel (unas cinco horas).

II.D.3.3. *Tinción de proteína en gel*

Una vez terminada la electroforesis, se sacaban los geles de los tubos y se sumergían en una solución de Azul brillante de Coomasie G al 1% (p/v) en ácido acético al 7% (p/v), durante 30-40 min. A continuación se lavaban un par de veces con una mezcla de acético 7,5% y metanol al 5% (v/v) y se eliminaba el exceso de colorante mediante sucesivos cambios de esta solución. Una vez desteñidos, se guardaban en una solución de ácido acético al 7% (p/v).

II.D.3.4. *Localización de la actividad glutamina sintetasa en los geles*

Se procedía de la forma descrita por Kleinschmidt y Kleiner (1978). Los geles se sumergían en la mezcla de reacción para el ensayo de la actividad transferasa dependiente de Mn^{2+} (II.C.4.) a temperatura ambiente, durante 1 hora. Luego se transfería a la solución de $FeCl_3$ (ver II.C.4.) y se esperaba hasta que aparecía(n) la(s) banda(s) roja(s) correspondiente(s) al γ -glutamilhidroxamato formado.

II.D.3.5. *Localización de actividad diaforasa en los geles*

Para detectar esta actividad, se procedía según Wang y Raper (1970). El gel, se sumergía en una solución que contenía, en 100 ml de tampón fosfato sódico, 0,5 M pH 7,5, 50 mg de cloruro de *p*-nitroazultetrazolio (nitro-BT) y 55 μ moles de NADPH. El tubo se cubría con papel de aluminio para proteger

de la luz y se dejaba a temperatura ambiente durante varias horas hasta la aparición de las bandas moradas correspondientes al formazano que se produce al reducir nitro-BT. Los geles así teñidos, se transferían a una solución de ácido acético al 7,5% para su conservación. Las bandas desaparecen al cabo de un par de semanas.

II.D.4. Determinaciones espectrofotométricas

Las medidas colorimétricas se hicieron en un colorímetro BAUSCH & LOMB Spectronic, modelo 700 o en espectrofotómetros PYE UNICAM modelos SP8-100 UV y SP-1750 equipados todos con salida digital. Las medidas cinéticas se siguieron en los espectrofotómetros mencionados y en el modelo SP-1800, con registrador incorporado. Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro AMINCO modelo DW 2a.

Los coeficientes de extinción utilizados fueron: $6.220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para el NAD(P)H y $10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para el ferricianuro.

II.D.5. Determinación de proteína

La proteína se determinó según el método de Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones de Bailey (1967), utilizando ovoalbúmina como patrón.

II.D.6. Determinación de glutamato

Se siguió el método enzimático descrito por Bernt y

Bergmeyer (1974), que se basa en la reacción que tiene lugar entre el L-glutamato y el NAD^+ , catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, con una estequiometría de 1/1. La muestra, (50 μl) se añadía sobre 1,2 ml de una mezcla de reacción, contenida en una cubeta de 1 cm de paso de luz a temperatura ambiente, con los siguientes compuestos, en μmoles : Tampón glicina-hidrazina, pH 9,0, 500; NAD^+ , 6 y ADP, 9. Entonces se anotaba la absorbancia a 340 nm y se añadían 10 μl de L-glutamato deshidrogenasa de hígado de buey (preparación comercial, SIGMA, en tampón fosfato sódico, pH 7,3 y glicerol al 50%, libre de amonio, conteniendo 12 mg/ml y con una actividad específica de 40 U/mg). A continuación se registraba el incremento de absorbancia y cuando ésta se mantenía constante, al cabo de 1 hora aproximadamente, se anotaba este valor, que servía para calcular la cantidad de NADH formado, equivalente a la cantidad de glutamato presente en los 50 μl de la muestra. Como control de rutina, se preparaba un blanco que contenía 50 μl de agua, en vez de la muestra. También se efectuaron controles con glutamato auténtico en presencia de los demás componentes de la mezcla, para comprobar posibles interferencias: ninguna de las muestras analizadas interfería con este método de ensayo.

Con este método se pueden determinar cantidades de glutamato del orden 2 nmoles.

II.D.7. Ensayos anaeróbicos

Los ensayos espectrofotométricos en condiciones anaeróbicas

róbricas, se llevaron a cabo en tubos de vidrio óptico BAUSCH & LOMB, de 1 cm de diámetro, cerrados con tapones de goma de los que vienen provistos los tubos B-D Vacutainer 4827, BECTON-DICKINSON. La anaerobiosis se conseguía mediante sucesivos ciclos de evacuado y llenado con argon, en un aparato "MANIFOLD". El gas, de alta pureza, se hacía pasar previamente a través de un catalizador BASF, R3-11 calentado a 60°C, y el orificio producido en el tapón al ser atravesado por la aguja, se cubría con grasa de silicona. El volumen de la muestra era siempre menor que la cuarta parte de la capacidad del tubo. La transferencia de muestras de un tubo a otro se hacía mediante microjeringas herméticas HAMILTON, de las utilizadas para cromatografía de gases.

II.D.8. Desalinización

La eliminación de sales ó el cambio en la composición del tampón se efectuaba mediante filtración en gel en columnas de Sephadex G-25 (medium) de 60-70 x 16 mm Ø (ver II.D.2.2.) o bien por diálisis en "salchichas" de celulosa regenerada Visking, SERVA, de 25 µg de espesor con un tamaño de poro de 15-20 Å, siendo el límite de exclusión de 10.000-20.000 daltons.

II.D.9. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinaba en un pH-metro BECKMAN modelo Expandomatic SS2 o METHROM HERISAU, modelo E-512, provistos de escala expandida y de electrodo

combinado de vidrio. Como patrones, se utilizaron soluciones comerciales (BECKMAN y MERCK).

Cuando sólo se requería una medida aproximada, se utilizaban tiras de papel indicador (MERCK) con una resolución de $\pm 0,5$ unidades de pH.

II.E. REACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: ALDRICH: ferrozina y bis-acrilamida. BIO RAD LABORATORIES: Bio gel A/1,5 m. BOEHRINGER: Piridín nucleótidos. DIFCO: Agar, manitol. LKB: Bio gel Aca 44. MERCK: acrilamida, DEAE-celulosa, orto- y bato-fenantrolina, α -KG y otros reactivos de grado analítico. PANREAC: algunas sales empleadas en los medios, manitol. PHARMACIA: geles de Sephadex. S.E.O.: N₂ y argon de alta pureza. SERVA: BSA, MV, TEMED, DTE. SIGMA: Azul Coomasie, Tris, Tricina, MES, MOPS, FAD, adenín nucleótidos, Reactive Blue-Sepharose CL 6 B, catalasa, GDH, glucosa oxidasa, glutamina, AOA, deoxicolato, DTE y otros reactivos de grado analítico.

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

III. RESULTADOS

III.A. EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO CELULAR

Con el fin de determinar el efecto de la variación de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de las enzimas de la asimilación del amonio, y fundamentalmente para investigar la existencia o no de glutamato deshidrogenasa en células de *A. chroococcum* se cultivó el organismo en medios con N_2 , NH_4^+ , NO_3^- o glutamato como única fuente de nitrógeno. Los resultados se presentan en la Tabla I.

Estos experimentos son muy indicativos desde un punto de vista cualitativo. Las diferencias cuantitativas entre los niveles de actividad de las distintas enzimas dependen, en cierta medida, del estado de las células, esto es, de la etapa de crecimiento en que se hallen en el momento de recogerlas. En los experimentos presentados, las células se recogieron durante su fase exponencial de crecimiento. Los datos expuestos son el promedio de, al menos, dos determinaciones.

Lo más destacable de la Tabla I es, sin lugar a duda, la ausencia prácticamente total de glutamato deshidrogenasa en los extractos, cualquiera que sea la fuente de nitrógeno disponible por las células.

Se puede observar también que el nivel de glutamato sintasa solamente sufre ligeras variaciones, siendo el doble en células cultivadas con NO_3^- o NH_4^+ , que en células cultivadas con N_2 ó glutamato.

El nivel de glutamina sintetasa varía con la fuente

Tabla I

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN CELULAS DE *A. chroococcum* CULTIVADAS EN MEDIOS CON DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO

Fuente de nitrógeno ^(a)	ACTIVIDADES ENZIMATICAS (mU/mg) ^(b)				
	Glutamina sintetasa ^(c)			Glutamato sintasa	Glutamato deshidrogenasa ^(e)
	con Mn ²⁺	con Mg ²⁺	Mg ²⁺ /Mn ²⁺ (d)		
N ₂	130	161	1,24	17,4	<1
KNO ₃ , 8 mM	260	75	0,29	39	<1
NH ₄ -acetato, 30 mM	908	173	0,19	39	<1
Glutamato-Na, 20 mM	128	133	1,04	17	<1

(a) Los medios se prepararon como se indica en II.A.1. y II.A.3.

(b) Las actividades se determinaron en extractos crudos del tipo II (II.B.2.).

(c) La glutamina sintetasa se determinó mediante el ensayo de la "transferasa" (II.C.4.).

(d) Mg²⁺/Mn²⁺ es el valor de la relación entre la actividad transferasa en presencia de Mg²⁺ y la actividad en ausencia de este catión. (II.C.4.).

(e) Los resultados fueron los mismos tanto en el ensayo de la desaminación reductiva con NAD(P)⁺ a pH 7,5 y 9,0, como en el de la aminación oxidativa con NAD(P)H a pH 7,5 (ver II.C.3.).

de nitrógeno disponible. (La actividad con Mn^{2+} da una idea de la cantidad total de enzima y la actividad con Mg^{2+} es indicativa de la enzima catalíticamente útil, cuando existe un proceso de regulación por adenilación-desadenilación (Stadtman *et al.*, 1970). Cuando la fuente de nitrógeno es amonio a concentración elevada, la actividad transferasa dependiente de Mn^{2+} es alta (unas 8 veces mayor que con N_2) pero la proporción de enzima fisiológicamente significativa es baja (20% aproximadamente).

Cuando las células se cultivan con glutamato como fuente de nitrógeno, en condiciones aeróbicas sin suprimir el N_2 del aire, los niveles de glutamina sintetasa y la proporción de enzima catalíticamente activa, son prácticamente idénticos a los de células cultivadas con N_2 como única fuente de nitrógeno. En ambos casos, la glutamina sintetasa está fundamentalmente en su forma activa.

Se pudo demostrar también que si a un cultivo de células con amonio se añade metionina sulfoximina (inhibidor de la glutamina sintetasa) el crecimiento se detiene.

Además, pudimos comprobar que el crecimiento de las células es más rápido con NO_3^- que con el resto de las fuentes de nitrógeno suministradas.

Finalmente, hay que indicar que la actividad específica de la glutamato sintasa es del mismo orden en extractos crudos del tipo I (II.B.1.) y que en estos extractos tampoco

se ha podido detectar actividad glutamato deshidrogenasa, cuando las células se cultivan con nitrato.

III.B. LOCALIZACION DE LAS ACTIVIDADES GLUTAMATO SINTASA Y GLUTAMINA SINTETASA DE *A. chroococcum*

Después de centrifugar un extracto crudo del tipo I a 120.000 x *g* durante 120-150 min, una cierta cantidad de ambas enzimas, se encontraba siempre en el sedimento. En el caso de la glutamina sintetasa, esta fracción que sedimentaba, constituía el 40% o más de la actividad presente en el extracto crudo. En cuanto a la glutamato sintasa, la cantidad de enzima que se hallaba en el sedimento tras la ultracentrifugación variaba de unas preparaciones a otras, siendo menor a pH 6,5 que a pH 7,5 y menor que el 2% del total en presencia de deoxicolato al 1% (p/v) a pH 7,5.

Estos resultados indican que ambas enzimas probablemente están asociadas con la membrana plasmática.

III.C. GLUTAMINA SINTETASA. CONDICIONES OPTIMAS PARA SU PURIFICACION

Los experimentos cuyos resultados se presentan en este apartado fueron encaminados al establecimiento de unos tratamientos adecuados para la purificación de la glutamina sintetasa de *Azotobacter chroococcum*.

Las células utilizadas como material de partida, se

cultivaron siempre en medio estándar (II.A.2.) y se rompieron por tratamiento con ultrasonidos. Los tampones utilizados fueron: Imidazol-HCl, 0,2 M pH 7,5 + MnCl₂, 5 mM e Imidazol-HCl, 50 mM pH 7,5 + MnCl₂, 5 mM, que se abreviarán como "tampón I" y "tampón i" respectivamente. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 0-4°C salvo que se indique lo contrario. El porcentaje de saturación de (NH₄)₂SO₄ se calculó para 25°C a pesar de que las precipitaciones se realizaron en frío.

Las actividades, donde se especifican, corresponden siempre al ensayo de la "transferasa" (ver II.C.4.).

III.C.1. Preparación de los extractos crudos

Los extractos crudos para la purificación de la glutamina sintetasa se prepararon de la misma forma que se explica en II.B.1. pero sustituyendo el tampón M por tampón I. La actividad específica de estos extractos solía oscilar entre 150-250 mU/mg.

III.C.2. Tratamiento por calor

La glutamina sintetasa de *A. chroococcum* es muy resistente al calentamiento, como se ha podido comprobar en estos estudios. Esta gran resistencia a la inactivación térmica proporciona una gran ventaja con vistas a su separación, en forma activa, de otras proteínas y compuestos (ácidos nucleicos) presentes en los extractos crudos de *A. chroococcum*,

mucho más termolábiles.

La termorresistencia antedicha, es absolutamente dependiente del ión Mn^{2+} : si se somete a un calentamiento de 50°C durante 1 hora ó 65°C durante 30 min, un extracto crudo, en tampón Imidazol-HCl pH 7,5 a varias concentraciones, en ausencia de $MnCl_2$, la actividad desaparece totalmente, mientras que si se añade esta sal a concentración 5 mM, la actividad permanece íntegramente en el sobrenadante, después de centrifugar a 27.000 x g durante 15 min para separar el material celular que precipita (coagula) al sufrir el tratamiento por calor.

Este tratamiento elimina alrededor del 80% de la proteína presente en el extracto crudo, al tiempo que la glutamina sintetasa no sufre ninguna alteración que afecte lo más mínimo a sus propiedades catalíticas. La preparación resultante es una solución muy "limpia", con vistas a un posterior tratamiento cromatográfico.

III.C.3. Precipitación fraccionada con $(NH_4)_2SO_4$

El tratamiento de la preparación resultante del calentamiento en tampón I (apartado anterior), con $(NH_4)_2SO_4$ hasta una concentración de 35% de saturación, no provoca la precipitación de la glutamina sintetasa, pero ésta sí tiene lugar si se lleva nuevamente hasta un 60% de saturación. El incremento en la actividad específica después de este tratamiento no es excesivamente grande, pero es compensado con

una buena recuperación (70-75%) y con la obtención de una preparación enzimática altamente concentrada.

La duración de estos tratamientos fué de 20-30 min, con agitación suave y constante. El sulfato amónico se añadió en forma de solución saturada al 100%, con el pH ajustado a 7,5 con NH_4OH .

Cabe mencionar aquí el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre el ensayo de la actividad "transferasa": si no se dializan las preparaciones antes de medir la actividad, se obtienen valores menores en un 50% aproximadamente.

III.C.4. Filtración en gel

Para intentar conseguir preparaciones más puras de glutamina sintetasa se intentó el fraccionamiento por "tamizado molecular", utilizando geles de Bio-Gel AcA 44; Sephadex G-200 y Biogel A/1,5 m, equilibrados en tampón i. En todos los casos, la actividad glutamina sintetasa se localizaba en el volumen vacío resultando un incremento de la actividad específica de alrededor de 2, con una recuperación del 70-75%.

III.C.5. Cromatografía en DEAE-celulosa

Otro de los criterios de fraccionamiento investigados fue el de la carga electrostática. A juzgar por los resultados obtenidos, la glutamina sintetasa de *A. chroococcum*

Tabla II

RECUPERACION Y PURIFICACION DE LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO
DE PURIFICACION DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE *A. chroococcum*

Tratamiento	Recuperación ⁽¹⁾ (%)	Factor de purificación
Calentamiento (65°C, 30 min)	100	4,5-7
Precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70-75	2-2,5
Filtración en gel	70-75	2
Cromatografía en DEAE-celu- losa y concentración	65-70	4

(1) Referido a la actividad total de la preparación antes del tratamiento

Para una explicación detallada, consultar el texto.

debe poseer un punto isoeléctrico muy bajo, ya que se adsorbe fuertemente al intercambiador aniónico DEAE-celulosa. La adsorción tiene lugar en tampón i y la elución requiere una concentración de NaCl, 0,3-0,35 M.

Cuando la adsorción se lleva a cabo en las mencionadas condiciones, se lava la columna con NaCl, 0,2 M en tampón i, y se eluye con un gradiente lineal de NaCl establecido entre 0,2 M y 0,45 M, se obtiene una preparación cuya actividad específica se incrementa del orden de 4 veces, con una recuperación del 65-70%. La preparación está muy diluída por lo que se solía concentrar en una célula de ultrafiltración con agitación, AMICON equipada con una membrana DIAFLO PM-30 que sólo deja pasar moléculas con un peso molecular inferior a 30.000. Si se utiliza una membrana tipo XM-300, la glutamina sintetasa no queda retenida.

La máxima actividad específica obtenida mediante un proceso de purificación basado en las etapas mencionadas a lo largo de esta sección, ha sido de 18 U/mg.

En la Tabla II, se resumen estos resultados.

III.C.6. Procedimiento alternativo

Como se mostró anteriormente (III.B.), la glutamina sintetasa, debido a su enorme tamaño, o quizás debido a que se halla asociada con membranas, sedimenta casi completamente, al someter el extracto crudo a una centrifugación de

130.000 x g durante 150 min. En algunos casos se tomó como preparación de partida el sedimento resultante de esta centrifugación suspendido en un pequeño volumen de tampón i. Los resultados, en cuanto a rendimiento y factor de purificación, son similares a los obtenidos cuando se suprime esta centrifugación. La ventaja de este procedimiento es que se puede partir casi desde el principio de una preparación muy concentrada. Las respuestas a los distintos tratamientos mencionados en los apartados precedentes son muy parecidas, excepto en lo referente a la filtración en gel, que en este caso, proporciona un menor grado de purificación. Otra diferencia interesante se menciona en el apartado siguiente. A la preparación obtenida por este procedimiento la denominaremos preparación "P" y a la obtenida sin ultracentrifugación preparación "S".

III.C.7. Electroforesis analítica

Las preparaciones resultantes del último paso de purificación (cromatografía en DEAE-celulosa), "P" y "S", se sometieron a electroforesis analítica a pH 8,3, en geles de poliacrilamida. La distribución de las bandas de proteína es muy diferente en cada caso: Una "preparación P" con actividad específica 2 U/mg, dió fundamentalmente 5 bandas en gel de poliacrilamida al 5%, coincidiendo la banda mayoritaria con la de actividad glutamina sintetasa (ver II.D.3.4.).

Una preparación "S" (activ. especif., 18 U/mg) some-

tida a electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5%, dió como resultado la formación de un número de bandas de proteína mayor que el obtenido con la preparación "P". Como en el caso anterior, la más intensa correspondía a la actividad glutamina sintetasa (ver II.D.3.4.). Esta actividad no era muy acusada y no se pudo apreciar si las bandas minoritarias también la podrían presentar, ya que la cantidad de proteína en ellas fue muy baja. Kleinschmidt y Kleiner (1978) han demostrado que la glutamina sintetasa de *Azotobacter vinelandii* puede formar oligómeros con estados de agregación diferentes (8, 10, 12 y 24 subunidades), todos los cuales presentaban actividad transferasa.

III.D. PURIFICACION DE LA GLUTAMATO SINTASA

El proceso de purificación esquematizado en la Tabla III, se puede considerar significativo de todos los realizados, puesto que las diferencias entre unos y otros no eran muy grandes. En este caso se partió de 75 ml de extracto crudo II (ver II.B.2.) obtenido de células cultivadas en medios estándar.

Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo a una temperatura de 0-4°C, salvo que se indique lo contrario. Los porcentajes de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se calcularon para 25°C aunque las precipitaciones se realizaron en frío.

Tabla III

PURIFICACION DE LA GLUTAMATO SINTASA DE *A. chroococcum*

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad especifica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
I. Extracto crudo	628,5	8,325	0,012	"100"	"1"
II. Primera precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	61,6	17,368	0,282	209	23
III. Eluato de DEAE-celulosa	13,0	14,742	1,132	177	93
IV. Segunda precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,1	12,112	1,734	145	143
V. Eluato de Azul-Sefarosa	0,7	4,500	6,428	54	527

- El procedimiento se explica detalladamente en el texto.

Los tampones utilizados a lo largo de la purificación fueron: MOPS-KOH, 50 mM pH 7,5 + DTE, 0,5 mM que se referirá abreviadamente como "tampón M" y MES-KOH, 50 mM pH 6,5 + DTE, 0,5 mM que se abreviará como "tampón m".

III.D.1. Primera precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Se añadieron 50 ml de una solución saturada (100%) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ajustada a pH 7,5 con NH_4OH y preenfriada) al extracto crudo, que quedó a 40% de saturación, y se mantuvo con agitación suave durante 30 min. La mayor parte del deoxicolato precipita en esta etapa (Tzagoloff y Penefski, 1971) y el sedimento solía ser voluminoso. Este se descartó y al sobrenadante (97 ml) se añadieron 19,4 ml de la solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; el porcentaje de saturación resultante es 50%. Se agitó durante 15 min y se centrifugó a $27.000 \times g$, 15 min. En este paso, el 8% de la enzima se perdió, ya que precipitó una parte de ella y el sedimento se desechó. Finalmente, el sobrenadante se llevó al 60% de saturación añadiendo 40 ml de la solución saturada; se mantuvo en agitación suave durante 30 min y se centrifugó a $27.000 \times g$, 15 min; se desechó el sobrenadante y el tubo de centrifugación se lavó con una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% de saturación. El sedimento se resuspendió en 5 ml de tampón M, y se dializó frente a 500 ml del mismo tampón con tres cambios, durante 12 horas.

La actividad en las distintas fracciones se midió después de someterlas a diálisis.

III.D.2. Cromatografía en DEAE-celulosa

El sedimento de 60% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dializado se colocó en una columna de DEAE-celulosa (200 x 20 mmØ) previamente equilibrada en tampón M. Después de aplicar la muestra, la columna se lavó con 120 ml del mismo tampón suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 1% de saturación. La enzima se eluyó con un gradiente lineal de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (150 ml al 1% + 150 ml al 5%) en el mismo tampón. La mayor parte de la actividad enzimática se halló en las fracciones que se eluyeron entre, aproximadamente, el 2,5% y el 4% sat. Estas fracciones se juntaron.

III.D.3. Segunda precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El conjunto de fracciones de la etapa precedente (42 ml) se llevó a 60-65% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, añadiendo 65 ml de solución saturada y se dejó con agitación suave, durante 1 hora; a continuación se centrifugó a 27.000 x g, 20 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento se suspendió en 3 ml de tampón m. Esta suspensión se agitó suavemente durante 2 horas, se centrifugó luego a 27.000 x g, 20 min y se descartó el sedimento; el sobrenadante se dializó frente a un volumen 20-30 veces mayor de tampón m, con varios cambios.

Tabla IV

RESUMEN DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA PONER A PUNTO LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AZUL-SEFAROSA^(a)

Sistema eluyente	pH ^(b)	Elución ^(c)	Observaciones
KCl, 0,5 M	6,5	+	Se diluye mucho; enzima inestable.
KCl, 1 M	6,5	+	Poca purific.; recuperación total; enz. muy diluida; inestable.
α -KG, 10 mM + Gln, 10 mM	6,5	-	_____
NADP ⁺ , 1 mM	6,5	-	_____
NADPH, 0,1 mM + α -KG, 10 mM	6,5	-	_____
NADPH, 0,5 mM + "	6,5	-	_____
Ninguno	7,5	+	Se diluye mucho; enzima muy inestable; recuperación aceptable.
NADPH, 0,5 mM + α -KG, 10 mM	7,5	+	Poca recuperación
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 4% sat.	6,5	-	_____
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 8% sat.	6,5	+	Buena recuperación

(a) La adsorción se realizó a pH 6,5 con tampón m.

(b) Las eluciones a pH 6,5 se realizaron con el sistema tampón m; a pH 7,5, en tampón M.

(c) + indica "deadsorción" de la enzima; - indica que la enzima seguía adsorbida en la columna, lo que se comprobaba haciendo pasar una solución de KCl 1 M en tampón m, después del tratamiento con cada uno de los sistemas eluyentes indicados.

III.D.4. Cromatografía en Azul-Sefarosa

III.D.4.1. *Pruebas preliminares*

Las pruebas realizadas para encontrar unas condiciones de elución adecuadas están resumidas en la Tabla IV. A pH 7,5, la enzima se retiene algo al pasar por la columna pero no queda totalmente adsorbida. A pH 6,5, se adsorbe completamente.

III.D.4.2. *Procedimiento óptimo*

En vista de los resultados resumidos en la Tabla IV, se juzgó apropiado eluir la enzima mediante el aumento gradual de la fuerza iónica, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se escogió esta sal y no KCl por dos razones principales: Por un lado el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ había resultado ser un activador de la enzima dando magníficos rendimientos en las etapas primeras; además, la enzima es más estable en presencia de esta sal que en presencia de KCl; en segundo lugar, a igualdad de fuerza iónica (0,5) el KCl (0,5 M) es capaz de deadsorber la enzima del gel, mientras que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4%) no, lo que permite un lavado más exhaustivo de la columna antes de eluir la enzima, y eliminar, por tanto, mayor cantidad de impurezas indiferentes a la naturaleza del anión.

Se procedió de la siguiente manera, el sedimento dializado de la etapa anterior se diluyó 4 veces y se colocó en una columna de Azul-Sefarosa (ver Secc. II.D.2.3.) equilibrada previamente en tampón m. Después de introducir la muestra,

se lavó la columna con 20 ml de tampón m y a continuación con otros 20 ml del mismo tampón al 3% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 ml al 3% + 100 ml al 12%). La enzima se detectó en las fracciones recogidas al 8%, aproximadamente.

Las fracciones que contenían la mayor parte de la enzima se juntaron. El conjunto contenía el 75% de la actividad que se aplicó a la columna. A continuación se concentró la solución (47 ml) utilizando una célula de ultrafiltración con agitación AMICON modelo 52, equipada con una membrana DIAFLO PM-30, que retiene los compuestos de peso molecular superior a 30.000 D. Para obligar al líquido a pasar a través de la membrana se aplicó nitrógeno a una presión de 0,4 Kg/cm².

III.D.5. Inclusión de un paso de filtración en gel en el proceso de purificación

Se ha intentado el uso de esta técnica pero, hasta el momento, no se han encontrado las condiciones adecuadas, ya que, por causas no esclarecidas aún, pero que admiten ciertas elucubraciones, cuando la enzima activa y concentrada se introduce en una columna de Bio-Gel A/1,5 m (equilibrada en tampón M o m, en presencia o no de KCl, 0,1 M ó de FAD, 20 μM) desaparece toda la actividad catalítica.

III.D.6. Análisis electroforético de la fracción

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilami-

da al 7,5% y pH 8,3. El número de bandas de proteína formado resultó ser sorprendentemente elevado, si bien únicamente dos de ellas aparecían en cantidad considerable. Estas dos bandas se correspondían con las dos únicas que se formaron al teñir el gel con la mezcla de ensayo de la actividad NADPH-deshidrogenasa (NADPH-diaforasa) (II.D.3.5.). El nitro-BT, con un potencial redox, $E'_0 = -0,050$ V (Nachlas *et al.*, 1966), es capaz de aceptar electrones de un considerable número de oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H, entre ellas la glutamato deshidrogenasa. Es muy probable, por tanto, que la glutamato sintasa se comporte de idéntica manera a este respecto, y que una de las 2 bandas mencionadas corresponda a esta enzima.

Se consideró la posibilidad de que algunas de las bandas minoritarias que aparecen después de someter la muestra a electroforesis, podrían corresponder a una misma enzima en distintos estados de agregación. Para intentar aclarar esta cuestión, se trató la preparación con SDS y se analizó de nuevo electroforéticamente (ver Secc. II.D.3.2.). Todas las posibles formas poliméricas quedarían disgregadas y las únicas formas moleculares presentes deberían ser las subunidades elementales. El número de bandas de proteína resultantes debería ser menor y efectivamente, el resultado fue que este número se redujo a la mitad aproximadamente.

III.D.7. Estabilidad

La fracción V de la tabla de purificación es inestable. De las condiciones ensayadas, el DTE a concentración superior a 0,5 mM es el compuesto más eficaz para estabilizar a la enzima. No obstante, en estas condiciones se perdía el 50% de la actividad en 4 días a pH 6,5.

Durante los trabajos encaminados a purificar la enzima se observó que el factor más importante para conservar la actividad enzimática en cualquier preparación, era la concentración de la enzima: cuanto más concentrada está, es más estable. Nosotros hemos observado que el aumento de la concentración de proteína por adición de seroalbúmina, no resulta eficaz en este sentido. Si las precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no se realizan lo antes posible, se puede llegar a perder un 30% de actividad en 24 h, tanto en el extracto crudo como en el eluato de DEAE.

Ni el α -cetoglutarato, ni la glutamina, ni ambos juntos, ni tampoco el FAD tienen un efecto en cuanto a la estabilización de la enzima poco concentrada. El EDTA sí es efectivo por sí solo, pero menos que el DTE, y en presencia de éste, su efecto es nulo.

La preparación II de la tabla de purificación pierde el 70% de la actividad en 15 días, en tampón M a 0°C. A -15°C con glicerol al 50%, la actividad se conserva íntegra durante el mismo período de tiempo.

III.E. PROPIEDADES CINÉTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DE LA GLUTAMATO SINTASA

III.E.1. Requerimiento de los sustratos

En la Tabla V se puede observar que la oxidación de NADPH por la glutamato sintasa es absolutamente dependiente de la presencia simultánea de α -cetoglutarato y glutamina. Cuando falta uno de estos dos compuestos, tiene lugar una lenta oxidación de NADPH, debida sin duda, a la acción de algún componente termolábil de la preparación enzimática. Este componente es seguramente una enzima con actividad NADPH: O_2 -oxidoreductasa cuya independencia de la glutamato sintasa no puede asegurarse.

Cuando se sustituye la glutamina por NH_4Cl , la velocidad de oxidación de NADPH equivale a la actividad oxidasa, indicando ausencia total de actividad glutamato deshidrogenasa en estas condiciones.

La sustitución de α -cetoglutarato por oxalacetato o piruvato no aumenta la velocidad de oxidación de NADPH debida a la oxidasa.

Si en vez de NADPH se pone NADH, se observa una actividad oxidasa que provoca la desaparición de 15,2 nmoles de NADH/min. La adición de α -cetoglutarato, glutamina y NH_4Cl por separado o combinados como en la Tabla V, indica ausencia absoluta de glutamato sintasa o glutamato deshidrogenasa dependientes de NADH.

Tabla V

REQUERIMIENTO DE LOS SUSTRATOS POR LA GLUTAMATO SINTASA

Sistema			NADPH oxidado (nmoles/min)
α -KG	Gln	NH_4^+	
-	-	-	1,0
+	-	-	1,1
+	+	-	26,6
+	-	+	1,0
-	+	-	1,0

La preparación utilizada procede de una precipitación fraccionada del extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen de 1 ml conteniendo 0,17 mg de proteína (20 μ l), y los siguientes μ moles de sustratos: α -KG, 10; Gln, 10; NH_4Cl , 50; NAD(P)H, 0,12, en tampón MOPS-KOH, 0,2 M pH 7,5. Las demás condiciones como se indica en "Materiales y Métodos" (II.C.1.1.).

Si no se pone enzima, o ésta se calienta antes (5 min en agua hirviendo), el valor de NADPH oxidado es cero, con cualquiera de los sistemas.

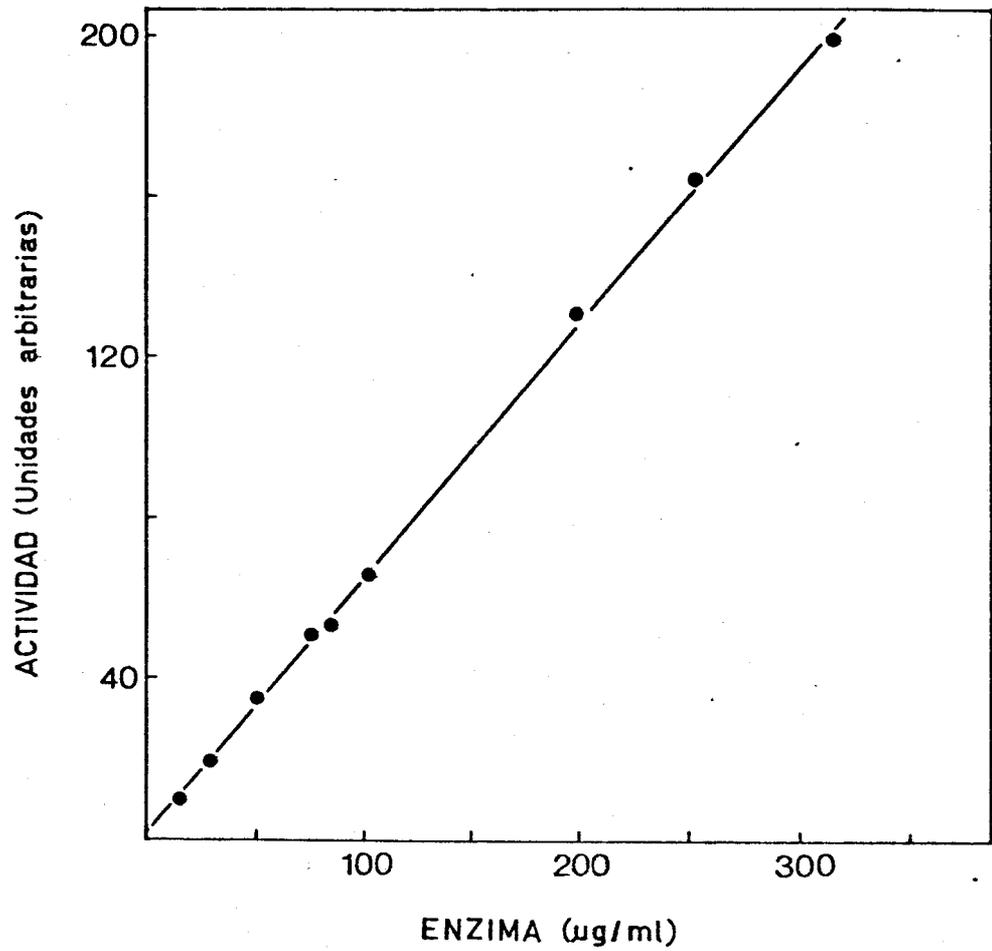


FIG. 1. *Correlación entre cantidad de enzima y actividad.* La preparación utilizada procede de una precipitación fraccionada del extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conteniendo $12,14 \text{ mg/ml}$ de proteína y con una actividad específica de 175 mU/mg . Con condiciones de ensayo estándar (II.C.1.1.).

III.E.2. Correlación entre la concentración de enzima y la actividad

En la Fig. 1 se ha representado la velocidad de la reacción catalizada por la glutamato sintasa frente a la cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción. Como se observa, existe una proporcionalidad estricta entre ambas. El índice de correlación de la recta obtenida es 0,9991.

III.E.3. Estequiometría de la reacción

Los resultados mostrados en III.E.1. indican que, casi con absoluta certeza, la única reacción posible catalizada por la preparación es la de transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono carbonílico del α -cetoglutarato, reducido por NADPH, con la consiguiente producción de 2 moles de glutamato. No obstante, era necesario demostrar la formación de glutamato con una estequiometría de 2:1 respecto al NADPH. En la Tabla VI se presentan los resultados de un experimento encaminado a demostrar esa relación. La relación entre el glutamato formado y el NADPH oxidado es de aproximadamente 2/1.

III.E.4. Efecto de algunos aniones sobre la actividad

En el ensayo de la actividad glutamato sintasa se ha observado que tienen lugar efectos anómalos debidos a la naturaleza del tampón y a la concentración iónica. La actividad de la enzima resulta menor si el ensayo se lleva a cabo en tampón Tris-HCl o Imidazol-HCl en vez de MOPS-KOH o HEPES-KOH,

Tabla VI

ESTEQUIOMETRIA NADPH OXIDADO/GLUTAMATO FORMADO DE LA REACCION
CATALIZADA POR LA GLUTAMATO SINTASA

NADPH oxidado	278,5 nmoles
Glutamato formado	575,5 nmoles

$$\frac{\text{Glutamato formado}}{\text{NADPH oxidado}} = 2,07$$

Las condiciones de ensayo fueron las del ensayo espectrofotométrico estándar, excepto que se varió la concentración de NADPH. Se dejó transcurrir la reacción hasta que la absorbancia se mantuvo constante. Entonces se determinó enzimáticamente (como se describe en "Materiales y Métodos") el glutamato formado en una fracción alícuota de la mezcla de reacción. Paralelamente, en una cubeta aparte y en las mismas condiciones, se mantuvo la misma mezcla de reacción omitiendo el NADPH, para determinar el glutamato formado por la acción de la glutaminasa; éste se sustrajo del valor obtenido en la primera cubeta.

Se obtuvieron valores muy parecidos, en experimentos similares, con distintas concentraciones de NADPH.

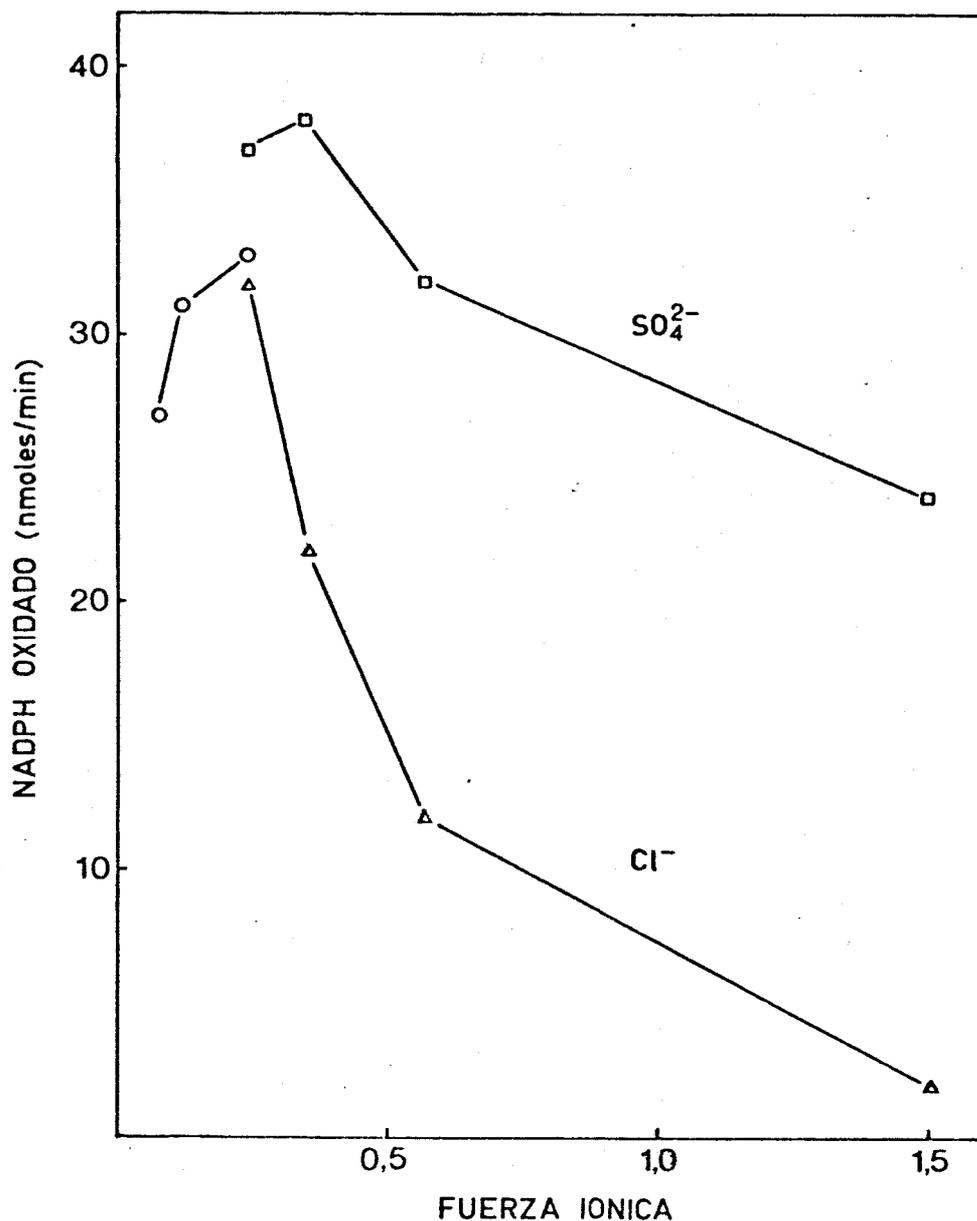


FIG. 2. Efecto de la fuerza iónica en el ensayo de la glutamato sintasa parcialmente purificada. Las condiciones experimentales fueron las del ensayo estándar (ver II.C.1.1.) excepto que la fuerza iónica se ajustó mediante la variación de la concentración del tampón o añadiendo cantidades adecuadas de distintas sales inorgánicas. (O—O), sin adición de sal; (□—□) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ó K_2SO_4 ; (Δ — Δ), con KCl ó NH_4Cl . La concentración de enzima fue, 0,3 mg/ml.

y mayor en tampón fosfato potásico (e incluso citrato potásico a pH 6,3), todos a pH 7,5. También se ha observado que estos efectos son más acusados si la enzima se extrae y se almacena con tampón Imidazol-HCl o Tris-HCl, y menos si la enzima ha sido tratada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En la Fig. 2 se presenta la velocidad de la reacción catalizada por la glutamato sintasa cuando se añaden ciertas sales inorgánicas, a concentración variable, a la mezcla de ensayo. Se puede observar que existe un efecto potenciador debido al anión en el caso de las sales de sulfato y un efecto inhibidor debido al cloruro. No obstante, cuando la concentración iónica es muy elevada, el sulfato inhibe la reacción, aunque en menor grado que el cloruro.

Estos resultados tienen interés desde el punto de vista práctico, ya que el análisis de fracciones después de una cromatografía de intercambio iónico en la que se utilice un incremento de la fuerza iónica para conseguir la elución, puede dar resultados erróneos si la concentración de sal es elevada.

III.E.5. Influencia del pH

Como se observa en la Fig. 3, el pH de la mezcla de reacción afecta sensiblemente a la actividad enzimática, disminuyendo ésta bruscamente a pH superiores a 8,5 e inferiores a 7,5. El pH óptimo está comprendido entre 7,8 y 8,0. La "curva de pH" obtenida tiene una característica forma de "campana". En este experimento, se tuvo en cuenta la fuerza iónica, que

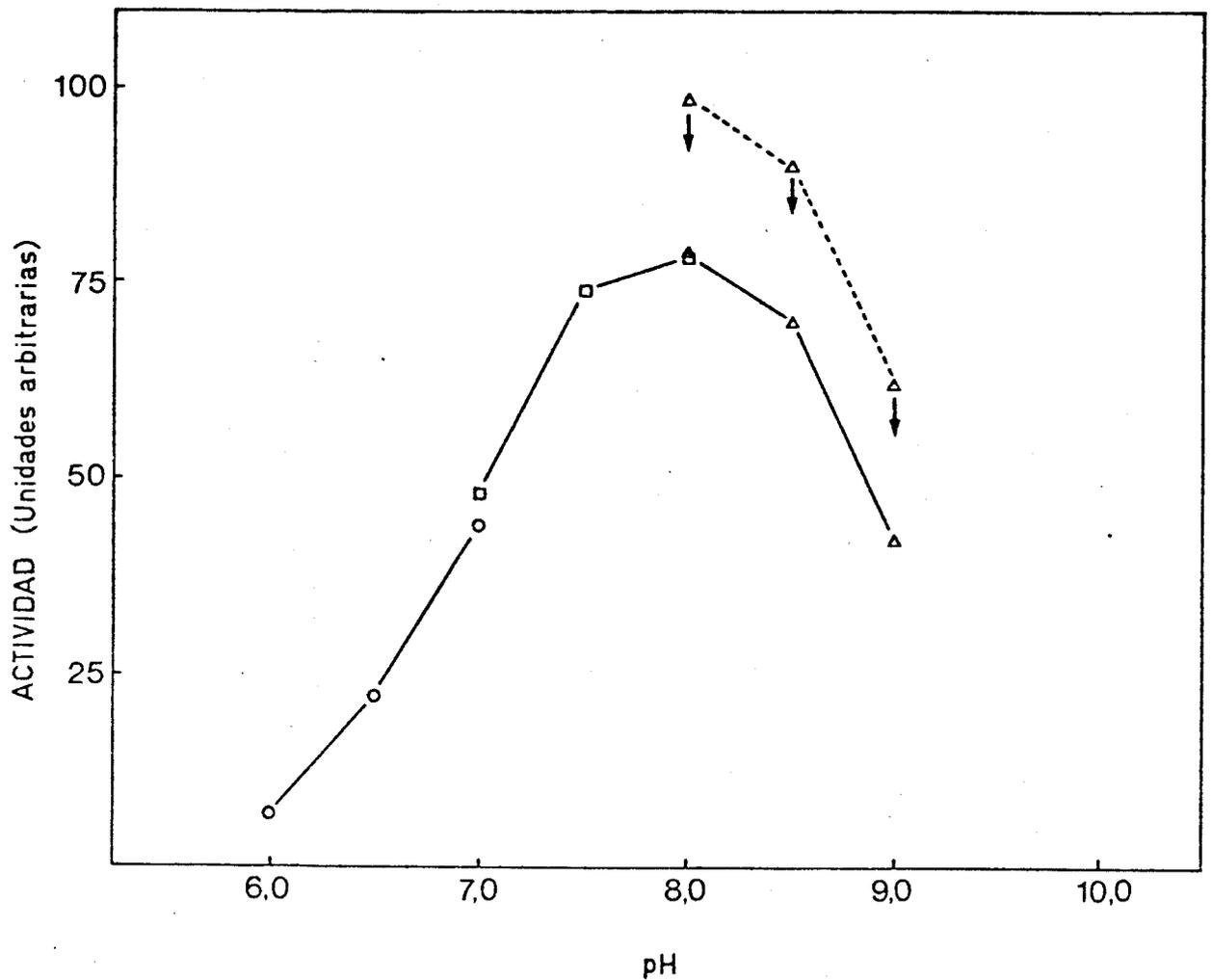


FIG. 3. *Influencia del pH en la actividad glutamato sintasa.* Condiciones de ensayo estándar, excepto que el tampón y la concentración del mismo se variaron. La preparación utilizada fue la fracción resultante de la precipitación fraccionada del extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dializada. Concentración de proteína: 0,1 mg/ml. (O—O), MES-KOH ($\text{pK}_a_2 = 6,15$); (□—□), MOPS-KOH ($\text{pK}_a_2 = 7,2$); (Δ—Δ), tricina-KOH ($\text{pK}_a = 8,15$), valores reales; (Δ—Δ), tricina-KOH, valores desplazados para dar continuidad a la curva. La concentración de cada tampón se ajustó de forma que todos tenían la misma fuerza iónica (0,12). Sin necesidad de añadir ninguna sal.

se ajustó a 0,12 para cada tipo de tampón a todos los pH medidos. Además todas las soluciones se prepararon a partir de la forma ácida, ajustando el pH con KOH. Esto es importante para evitar efectos debidos a la naturaleza del tampón, como se ha dicho en el apartado anterior.

A pesar de que el pH óptimo es más próximo a 8,0 que a 7,5, tanto los ensayos enzimáticos como el proceso de purificación se han realizado siempre a pH 7,5 o inferior por varias razones, a saber: la enzima es más estable a pH bajo (la autooxidación de grupos sulfhidrilos con formación de peróxido de hidrógeno, se previene a pH inferiores a 7 (Pinkus, 1977); MOPS es un compuesto biológicamente inerte, capaz de mantener el pH prácticamente constante al variar la concentración y al variar la temperatura entre 0°C y 20°C, y su capacidad de tamponamiento es mucho mayor a pH 7,5 que 8,0 ($pK_a = 7,2$); todos los compuestos disponibles con valores de pK_a alrededor de 8 carecen de estas propiedades, e incluso producen respuestas erróneas en los aparatos de medida. Y, en fin, las diferencias de actividad entre pH 7,5 y 8,0 son mínimas.

III.E.6. Parámetros cinéticos. K_m para α -cetoglutarato, glutamina y NADPH

Los valores de K_m que se presentan a continuación de ben considerarse como indicativos solamente, ya que, dada la complejidad de la reacción catalizada por la glutamato sintasa, los valores que se obtienen para un sustrato dependen en

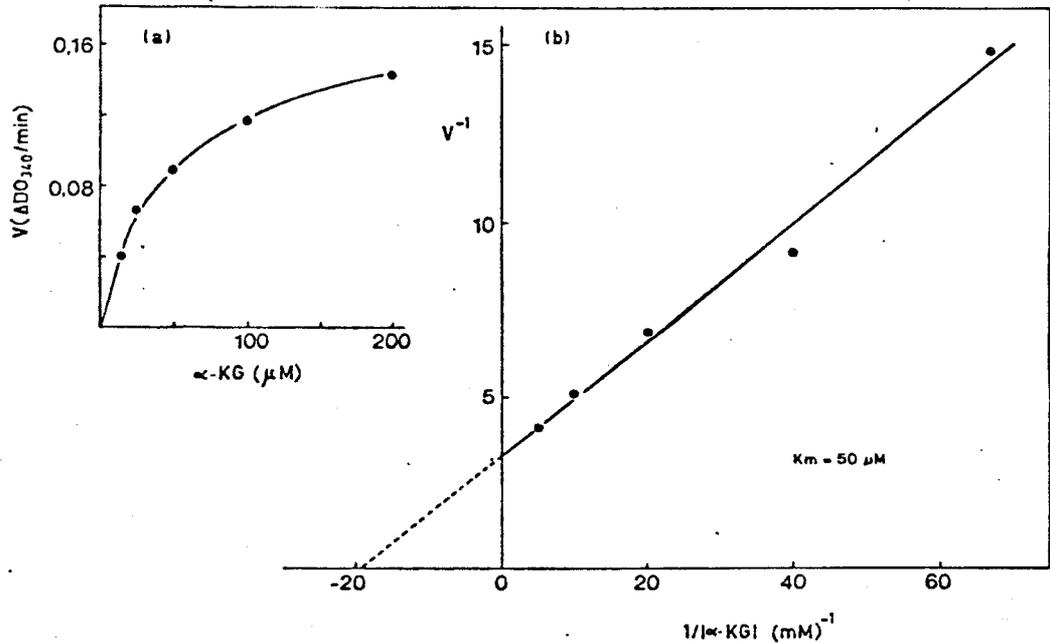


FIG. 4. Efecto de la concentración de α -cetoglutarato en la actividad de la glutamato sintasa parcialmente purificada. Las condiciones experimentales fueron las del ensayo espectrofotométrico estándar descritas en II.C.1.1., excepto que se varió la concentración de α -cetoglutarato y que la concentración de glutamato fue 5 mM. (a) Representación de velocidad *versus* concentración; (b) Representación de doble inverso. La preparación fraccionada utilizada es la resultante de una precipitación fraccionada del extracto crudo tipo I (II.B.1.) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dializada.

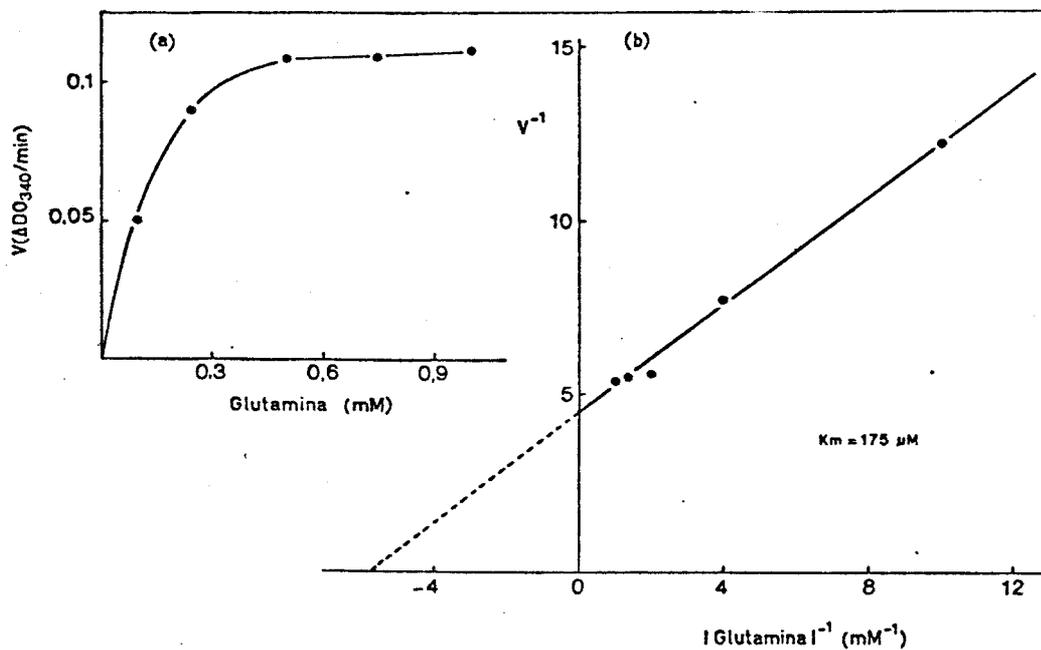


FIG. 5. Efecto de la concentración de glutamina en la actividad de la glutamato sintasa parcialmente purificada. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en la Fig. 4, excepto que se varió la concentración de glutamina. La concentración de α -cetoglutarato fue 2 mM.

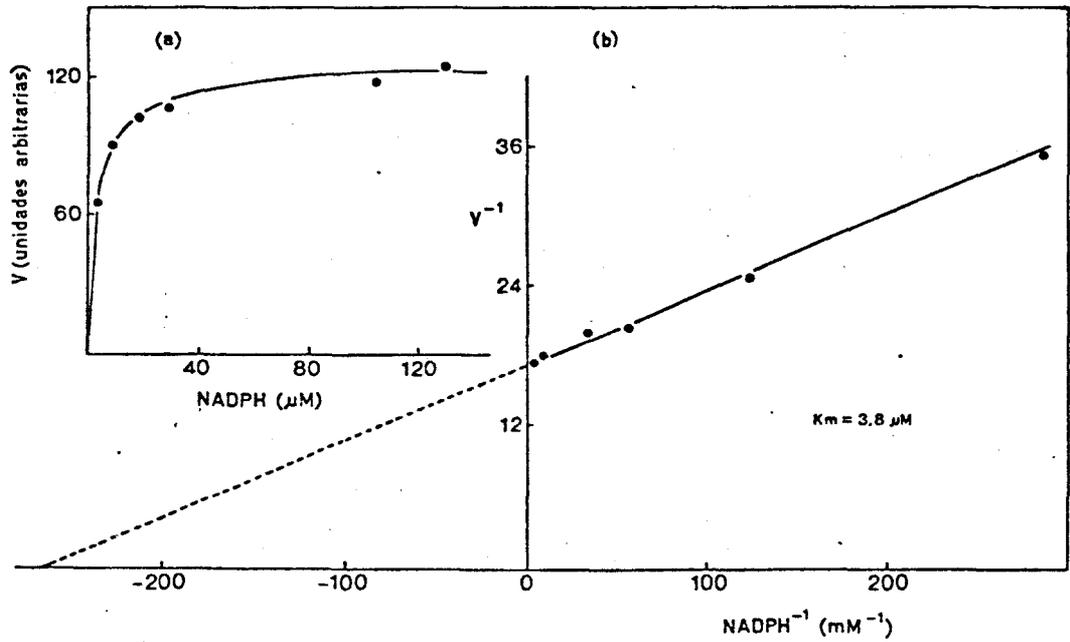


FIG. 6. Efecto de la concentración de NADPH en la actividad de la glutamato sintasa parcialmente purificada. Condiciones experimentales como en la Fig. 4, excepto que se varió la concentración de NADPH, y que las medidas se efectuaron en un espectrofotómetro AMINCO modelo DW 2a.

gran medida, de las concentraciones de los demás sustratos. No obstante sí pueden dar una idea de la afinidad de la enzima por cada uno de ellos y, desde un punto de vista práctico, sirven para conocer los niveles de concentración necesarios para conseguir condiciones saturantes de sustrato.

Los resultados de medir la velocidad de la reacción a distintas concentraciones de cada sustrato están representados en la Figuras 4, 5 y 6. En la parte (a) se muestran las curvas de velocidad y en la parte (b) las representaciones de doble inverso. Las concentraciones de los sustratos no variables fueron saturantes. Los valores obtenidos fueron: 50 μM , 176 μM y 4 μM para α -cetoglutarato, glutamina y NADPH, respectivamente.

III.E.7. Espectro de absorción

En la Figura 7 se presenta el espectro de absorción de la fracción V (ver Tabla III). Pueden observarse picos a 277, 376 y 425 nm y hombros a 450 y 475 nm. Puesto que la preparación no es homogénea, no pueden sacarse conclusiones acerca de las propiedades de la enzima derivadas de sus características espectrales únicamente. En otro experimento (III.F.1. y Fig. 8) se demuestra que la absorción entre 420 y 480 nm, a la que contribuye, sin duda, una agrupación flavínica y probablemente alguna forma de hierro, disminuye al reducir con ditionito y se incrementa al reoxidar con α -cetoglutarato y glutamina juntos.

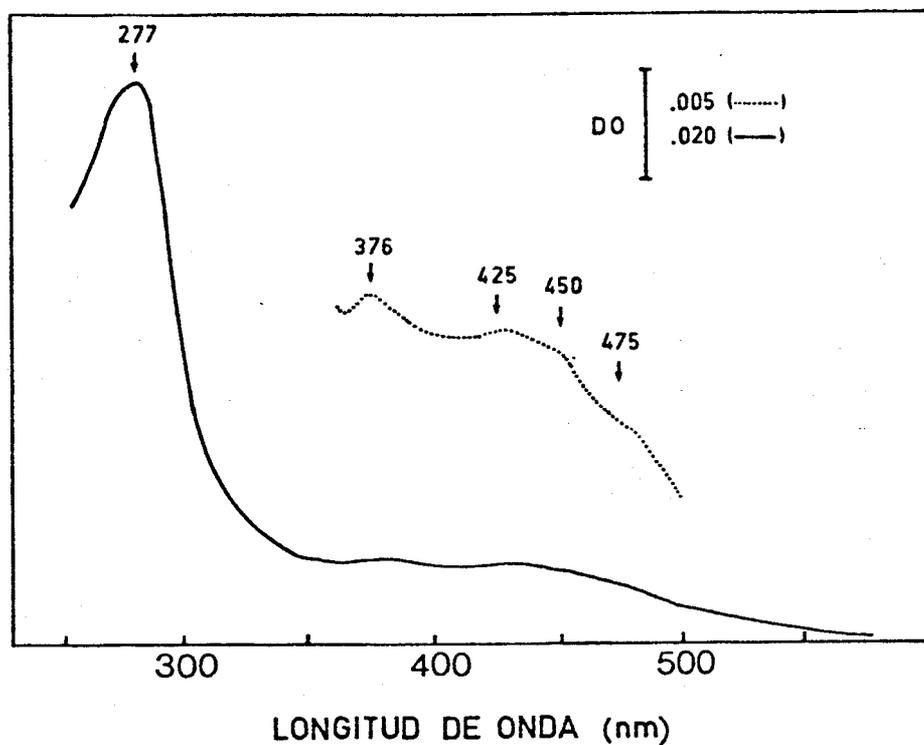


FIG. 7. Espectro de absorción de la glutamato sintasa parcialmente purificada de *A. chroococcum*. La preparación utilizada es la fracción V de la Tabla III (0,11 mg de proteína en 1 ml, en tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 + DTE, 0,5 mM). Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso de luz. En la cubeta de referencia se puso el componente dializable de la preparación enzimática. Se utilizó un espectrofotómetro AMINCO modelo DW 2a.

III.F. IMPLICACION DE GRUPOS ESPECIFICOS EN EL PROCESO CATALITICO

III.F.1. Papel de la flavina unida a la enzima

En el experimento aproximativo resumido en la Fig. 8 se investigó la función catalítica de la flavina unida a la enzima. En dicha figura se puede observar el espectro de absorción de la enzima nativa (1), con los picos y hombros característicos ya mostrados en la Fig. 7 (III.E.7.). La línea (2) representa el espectro de absorción inmediatamente después de la adición de ditionito. Como puede observarse, la absorbancia en la zona comprendida entre 420 y 500 nm, disminuye en condiciones reductoras, quedando además difuminados los máximos de absorción. La línea (3) representa el registro de la absorbancia entre 420 y 510 nm inmediatamente después de añadir glutamina y α -cetoglutarato a la enzima reducida por ditionito. Se observa que se recupera parte de la absorbancia original, con pronunciamiento de los picos y hombros nuevamente. La reoxidación es de un 30-40%. Después de este registro, se comprobó que aún quedaba ditionito en la cubeta. Las operaciones se llevaron a cabo en condiciones aeróbicas.

Este experimento sugiere la existencia de grupos con máximos de absorción entre 410 y 500 nm en su forma oxidada, que podrían estar involucrados en el proceso catalítico en virtud de sus propiedades de oxidación-reducción, entre ellos alguna especie flavínica.

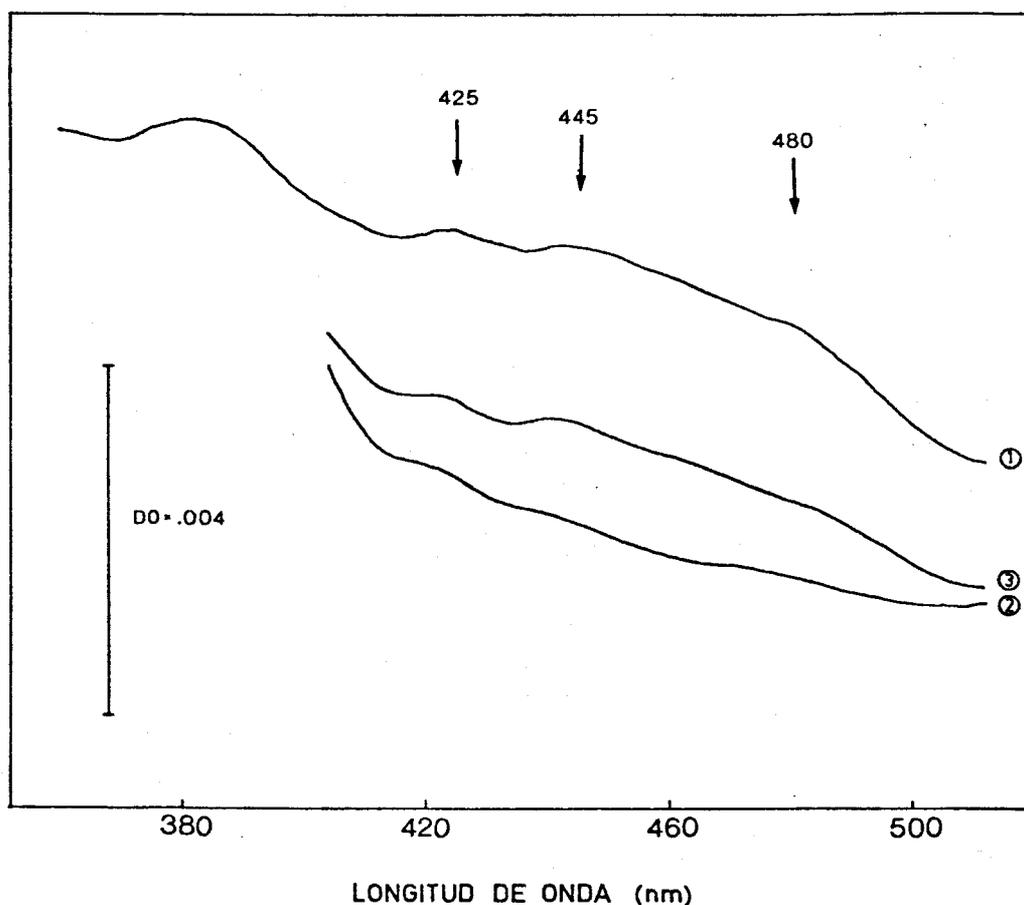


FIG. 8. Reoxidación por los sustratos, de la glutamato sintasa reducida químicamente. 0,8 ml de una preparación de glutamato sintasa parcialmente purificada (fracc. V en la Tabla III, 0,14 mg/ml en tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 + DTE, 0,5 mM), se colocaron en una cubeta de 1 cm de paso de luz. En la cubeta de referencia se pusieron 0,8 ml del componente dializable de la preparación enzimática. (1), espectro de absorción de la enzima nativa (oxidada). (2) id., tras la adición de 50 μ l de una solución de ditionito (8 mg/ml en tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 8,0); a la cubeta de referencia se añadió idéntico volumen de la misma solución. (3) Espectro de absorción después de añadir en ambas cubetas, 50 μ l conteniendo 10 μ moles de glutamina y 10 μ moles de α -cetoglutarato (pH 7,5). Se utilizó un espectrofotómetro AMINCO DW 2A. Los registros fueron hechos inmediatamente después de cada adición.

III.F.2. Presencia de grupos sulfhidrilos funcionales

La intervención de grupos -SH en el proceso catalítico se discutirá más adelante con detalle, a la luz de resultados presentados en III.H.2.4 y en esta sección. En los que se muestran aquí, se pone de manifiesto el efecto de pHMB, reactivo específico de grupos sulfhidrilos.

En la Tabla VII se presenta el efecto de una incubación de 5 min con pHMB a concentración 0,5 mM, sobre las actividades principal y secundarias (III.G.) catalizadas por la glutamato sintasa parcialmente purificada. Puede observarse que las actividades glutamato sintasa dependiente de NADPH y glutaminasa sufren inactivación completa, mientras que la actividad glutamato sintasa dependiente de MVH mantiene un nivel residual, que aunque bajo, es perfectamente detectable.

También se presentan en la Tabla VII, los resultados de un tratamiento con DTE, posterior al tratamiento con pHMB. Se pueden observar diferencias nuevamente entre la actividad dependiente de MVH y las otras dos actividades en los controles: la hidrólisis de glutamina en ausencia de los demás sustratos y la transferencia de su grupo amida al α -cetoglutarato, con NADPH como donador de electrones, tienen lugar con una velocidad mayor después de la incubación de la enzima con DTE, mientras que si el agente reductor es el MVH, el DTE no tiene efecto potenciador.

La reversión por DTE de la inactivación producida por

Tabla VII

INACTIVACION POR pHMB Y REVERSION POR DTE, DE LA GLUTAMATO SINTASA DEPENDIENTE DE NADPH Y DE MVH, Y DE LA GLUTAMINASA

Adición	Actividad relativa (%)					
	GUS (NADPH)		GUS (MVH)		Glutaminasa	
		+ DTE		+ DTE		+ DTE
Ninguna	100	125	100	95	100	125
pHMB, 0,5 mM	< 1	59	8	77	0	83

La preparación utilizada fué la resultante de la precipitación fraccionada del extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dializada. Esta preparación diluída (2,4 mg/ml y actividad específica 175 mU/mg) se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con tampón MOPS-KOH, 0,15 M, pH 7,5 y las adiciones indicadas en la tabla. Las actividades se determinaron en fracciones alícuotas de la mezcla de incubación. Después del tratamiento con pHMB, las preparaciones se incubaron con DTE, 3,3 mM durante 20 min y se determinaron las actividades enzimáticas en fracciones alícuotas de la mezcla de incubación.

Tabla VIII

EFFECTO DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE LA REACCION EN LA
INACTIVACION POR pHMB, DE LA GLUTAMATO SINTASA

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	4,1
Glutamina, 40 mM	67,6
α -cetoglutarato, 40 mM	5,5
Glutamato, 40 mM	10,6
NADPH, 60 μ M	4,1

La preparación es la misma que la utilizada en el experimento de la Tabla IX. La enzima, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con tampón MOPS-KOH, 0,1 M, pH 7,5 + pHMB, 65 μ M y las adiciones indicadas en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en fracciones alícuotas de la mezcla de incubación. El 100% de actividad es el de la enzima incubada en las mismas condiciones pero en ausencia de pHMB. Concentración de proteína: 2,4 mg/ml.

pHMB, parece menos acusada en el caso de la actividad dependiente de NADPH. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el DTE sólo se dejó actuar durante 20 min. Si se trata la enzima inactiva con DTE durante 40 min, la actividad mencionada se recupera hasta un valor de 75% de la original. Así pues, lo único que cabe decir es que, en el caso de la actividad con NADPH, la reversión por DTE es más lenta. Esto puede ser debido a que el probable grupo tiólico del sitio activo para el NADPH resulta más difícilmente accesible al DTE, o bien a que la transferencia de equivalentes de reducción desde este compuesto hasta el tiol susodicho (bloqueado por el pHMB) es más lenta. En la Tabla VIII, se presentan los resultados de un experimento en el que se incubó la enzima con pHMB en presencia de cada uno de los sustratos y productos de la reacción. Se observa que la glutamina impide considerablemente la acción del pHMB y, en un grado bastante menor, pero suficientemente marcado para sugerir ciertas explicaciones, el glutamato. Ni el α -cetoglutarato ni el NADPH tienen ningún efecto, tanto protector como potenciador.

III.F.3. ¿Participación de hierro en la catálisis?

De las características espectrales de la enzima (III.E.7.) parcialmente purificada parece deducirse la presencia de alguna forma de hierro que podría estar involucrado en el proceso catalítico. Con el fin de elucidar esta cuestión, se trató la enzima con reactivos cuya especificidad por el Fe es conocida, tales como ferrozina, *orto*-fenantrolina y

bato-fenantrolina, y se intentaron medir las tres actividades mencionadas en el apartado anterior. Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que la ferrozina (el más reactivo de los tres frente a Fe(II)) a concentración 0,7 mM, sólo inhibe un 20-25% de la actividad dependiente de NADPH en la preparación II (Tabla II) con 33 µg/ml de proteína, tanto si se añade en el ensayo, como si se incuba con la enzima antes del mismo, durante 3 min, en presencia de NADPH, 0,1 mM y α -KG, 4 mM. Estos resultados no son significativos mientras no se ensayen otras proporciones ferrozina/proteína y se utilicen preparaciones más puras de enzima.

En cuanto al efecto de los tres reactivos sobre las otras dos actividades, no se tienen resultados fidedignos, ya que no se han resuelto aún ciertas interferencias con los métodos analíticos.

III.G. REACCIONES SECUNDARIAS O PARCIALES CATALIZADAS POR LA GLUTAMATO SINTASA

III.G.1. Actividad glutaminasa. Caracterización y cinética

Li y Buchanan (1971) han sugerido, y otros autores han estado de acuerdo, que las amidotransferasas han tenido su origen evolutivo en la asociación de un péptido original con actividad glutaminasa, con transferasas diseñadas específicamente para distintos aceptores, bien como una subunidad separada o bien por incorporación covalente. De aquí que la mayoría de las amidotransferasas muestren una ligera

Tabla IX

CARACTERIZACION DE LAS ACTIVIDADES GLUTAMATO SINTASA
DEPENDIENTE DE MVH Y GLUTAMINASA

Sistema	Glutamato formado (nmoles/min)
Completo	47,6
-MV	27,7
-S ₂ O ₄ Na ₂	18,0
(-S ₂ O ₄ Na ₂ , -α-KG)	19,0
-α-KG	20,1
-Gln	1,8
-Gln, + NH ₄ Cl, 50 mM	1,5
-AOA	52,2
-Enzima	0,1
Completo, enzima hervida	0,3

Las condiciones experimentales fueron las del ensayo estándar (ver "Materiales y Métodos"). Se utilizó una preparación de glutamato sintasa dializada resultante de la precipitación fraccionada del extracto crudo con (NH₄)₂SO₄. Proteína en el ensayo: 0,78 mg/ml.

Tabla X

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LAS REACCIONES SECUNDARIAS CATALIZADAS
 POR LA GLUTAMATO SINTASA CON DISTINTOS GRADOS DE PUREZA EN
 RELACION CON LA ACTIVIDAD EN LA REACCION PRINCIPAL

Preparación	Actividad relativa (%)			
	GUS (NADPH)	GUS ($S_2O_4^{2-}$)	GUS (MVH)	Glnasa
II	100	2,3	8,2	6,0
V	100	3,6	9,4	1,5

Condiciones de ensayo estándar (ver "Materiales y Métodos"). Se utilizaron las fracciones que se indican en la tabla de purificación con los números II y V. GUS (NADPH): glutamato sintasa dependiente de NADPH; GUS ($S_2O_4^{2-}$): id., dependiente de ditionito; GUS (MVH): id., dependiente de ditionito y mediada por metil viológeno; Glnasa: glutaminasa. Para determinar la actividad NADPH-GUS⁻ en nmoles de glutamato formados $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$, se asumió la relación estequiométrica: NADPH oxidado/Glutamato formado = 0,5. Actividades específicas, expresadas en estas unidades fueron: II, 430; V, 12856.

actividad glutaminasa, que puede ser incrementada en presencia de todos los sustratos, como es el caso durante la reacción enzimática.

Nosotros hemos encontrado que las preparaciones de glutamato sintasa parcialmente purificada, poseen dicha actividad. No obstante, como se puede observar en la Tabla IX, esta actividad no se incrementa en presencia de α -cetoglutarato, al contrario de lo que ocurre con la enzima de *E. coli* (Mantsala y Zalkin, 1976). El efecto del sustrato, NADPH, sobre esta actividad no ha sido investigado debido a los inconvenientes que presentaría para la determinación enzimática (II.D.6.) del glutamato formado.

En la Tabla X, se presenta el porcentaje de actividad glutaminasa de dos preparaciones con distinto grado de pureza, en relación con la actividad enzimática principal, expresadas en términos de nmoles de glutamato formado. Puede observarse que la fracción V (Tabla III) sigue conservando actividad glutaminasa, si bien es cierto que en menor proporción que la fracción III.

En la Fig. 9, se representa la aparición de producto, glutamato, durante el curso de la reacción. Se puede ver que la cinética es lineal. En el tiempo cero, existe cierta cantidad de glutamato debido probablemente, a contaminación de alguno de los reactivos.

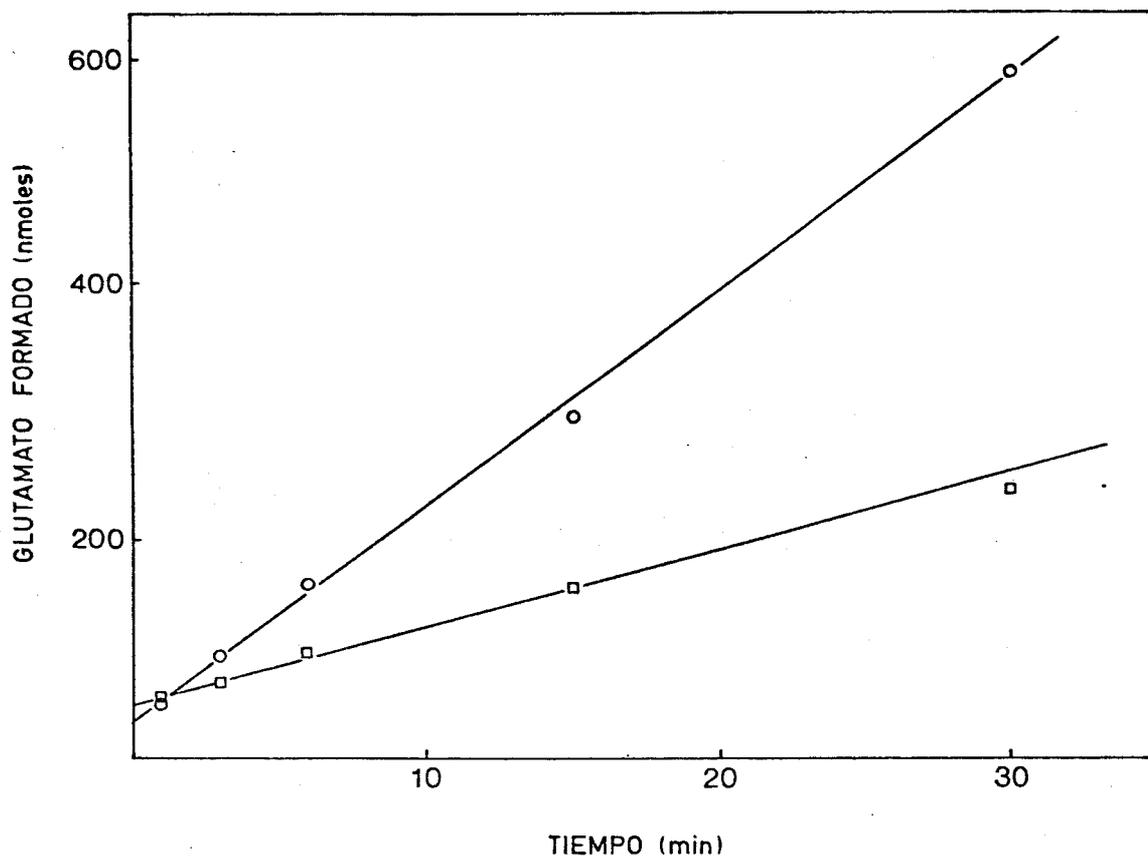


FIG. 9. *Cinética de las reacciones catalizadas por la glutamato sintasa dependiente de MVH y la glutaminasa. Condiciones experimentales como las indicadas en la Tabla IX. (O—O), glutamato formado en la mezcla de reacción completa. (□—□), glutamato formado omitiendo el ditionito y el α -cetoglutarato de la mezcla de reacción. Proteína, 0,78 mg/ml.*

III.G.2. Glutamato sintasa dependiente de ditionito. Caracterización y cinética

Cuando se sustituye el NADPH por ditionito en el ensayo de la glutamato sintasa, se observa una formación significativa de glutamato, como puede apreciarse en la Tabla IX. Si además se añade el transportador de electrones artificial metil viológeno, se incrementa marcadamente la formación de glutamato. Esta capacidad para utilizar poder reductor distinto del NADPH en la transferencia del grupo amido de la glutamina al α -cetoglutarato, se conserva en preparaciones más puras (Tabla X).

En la Tabla IX puede apreciarse, que cuando se omite el amino-oxiacetato (AOA) de la mezcla de reacción, la formación de glutamato es mayor, indicando la presencia de transaminasas en la preparación enzimática. El amino-oxiacetato, a concentración 5 mM no tiene ningún efecto sobre la actividad glutamato sintasa dependiente de NADPH.

En la Figura 9, se muestra la cinética de la reacción catalizada por la glutamato sintasa dependiente de ditionito y mediada por metil-viológeno. Se observa que la formación de glutamato es directamente proporcional al tiempo de reacción durante los 30 min ensayados.

III.G.3. Actividad glutamato deshidrogenasa

Ciertas amidotransferasas de glutamina pueden utili-

zar amonio en vez de glutamina (Prusiner y Stadtman, 1973), entre ellas la glutamato sintasa de *Aerobacter aerogenes* (Trotta *et al.*, 1974), *E. coli* K-12 (Mantsala y Zalkin, 1976) y *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mantsala, 1978), mientras que la enzima de *E. coli* B, no (Miller y Stadtman, 1972). Nosotros hemos encontrado que la glutamato sintasa de *A. chroococcum* carece de esta propiedad tanto cuando utiliza NADPH como reductor (Tabla V) como cuando el donador de electrones es el ditionito (III.G.1., Tabla IX). Independientemente de estos datos, el organismo carece de otra enzima distinta con actividad glutamato deshidrogenasa, como quedó demostrado en III.A.

III.H. EFECTO DEL NADPH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Los experimentos cuyos resultados se presentan en este apartado, fueron realizados con preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de extractos crudos del tipo I (ver II.B.1.) por precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posterior diálisis. En algunos casos se sometían, además, a ultracentrifugación. La precipitación se hacía en forma inversa, es decir, llevando primero el extracto crudo a 50% de saturación y resuspendiendo el precipitado en una solución al 30% en tampón m (ver III.D.). La actividad NADPH-oxidasa era siempre <4% de la actividad glutamato sintasa.

III.H.1. Anomalías en el ensayo de la actividad

III.H.1.1. *Dependiendo del estado de la preparación enzimática*

En algunas ocasiones, fundamentalmente con preparaciones poco frescas ó muy diluidas y por lo tanto inestables (tales como el sobrenadante que resulta de centrifugar el extracto crudo I a 120.000 x g ó el eluato de DEAE dializado y sin concentrar), la inestabilidad se manifestaba también durante el ensayo, dando cinéticas no lineales, esto es, la velocidad de oxidación de NADPH disminuía a medida que transcurría la reacción. Esta disminución no era achacable a inhibición por producto, y la velocidad se determinaba como se indica en II.C.1.1. Es muy probable que estos resultados anómalos sean debidos a inactivación por NADPH, de la enzima en estado altamente susceptible.

Nosotros hemos observado que la adición de cantidades relativamente bajas (alrededor de 50 mM) de NaCl daba como resultado una cinética lineal durante los primeros 3 ó 4 minutos, aunque con una velocidad menor.

III.H.1.2. *Dependiendo del orden de adición de los compuestos*

Como queda dicho en el apartado II.C.1.1., durante los ensayos de la actividad, la reacción se iniciaba por adición de la enzima. Es importante que esto sea así porque si se altera el orden de adición de los componentes de la mezcla de reacción, se obtienen valores de velocidad anormales (Tabla XI). Si lo que se añade en último término es el α -cetoglu

Tabla XI

PREINCUBACION DE LA GLUTAMATO SINTASA CON LOS SUSTRATOS ANTES DE ENSAYAR SU ACTIVIDAD. EFECTO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION

Sistema de incubación	Velocidad (nmoles NADPH oxidados/min)
Enzima	22,1
" más α -KG	21,3
" más α -KG + Gln	23,5
" más α -KG + NADPH	15,1
" más Gln	24,8
" más Gln + NADPH	4,4
" más NADPH	4,4

La enzima (60 μ g) se incubó a temperatura ambiente durante 5 min con el/los compuesto(s) indicado(s). Al cabo de ese tiempo, se añadió el/los que faltaba(n) para completar el sistema de ensayo. El volumen final fué 1 ml y el volumen de cada adición: α -cetoglutarato, 20 μ l; glutamina, 50 μ l y NADPH, 20 μ l. Las condiciones experimentales son las descritas en "Materiales y Métodos" (II.C.1.1.).

tarato, se obtienen valores acusadamente más bajos.

III.H.2. Inactivación por NADPH

Con el fin de esclarecer estos hechos experimentales, se procedió a incubar la enzima durante 5 min con cada uno de los componentes de la mezcla de reacción, por separado y combinados de todas las formas posibles, antes de iniciar la reacción. En la Tabla XI, se muestran los resultados de este experimento. La conclusión clara que se desprende de ellos es que el NADPH, cuando actúa solo sobre la enzima en las condiciones del ensayo estándar, provoca en ella un drástico cambio que se manifiesta en sus propiedades catalíticas. Por otro lado, se observa que el α -cetoglutarato, pero no la glutamina, impide, en cierto grado, la acción del NADPH.

Esta "inactivación" resultó altamente sorprendente por su rapidez y magnitud.

Nuestro siguiente paso fue proceder a la caracterización del fenómeno observado.

III.H.2.1. *Especificidad*

En el experimento cuyos resultados se presentan en la Tabla XII, se pusieron de manifiesto algunas de las características del proceso de inactivación. Entre ellas destaca la total incapacidad del NADH para sustituir al NADPH. Este dato concuerda con la absoluta especificidad que presenta la

Tabla XII

INACTIVACION DE LA GLUTAMATO SINTASA POR NADPH Y PROTECCION
POR ALGUNOS COMPUESTOS

Tratamiento	Actividad (%)
Control	100
NADPH	26
NADH	100
NADP ⁺	100
NADPH + α -KG, 10 mM	105
" " 1,25 mM	70
" + Glutamato, 1,25 mM	74
" + Ascorbato, 20 mM	40

La enzima, (60 μ g) se incubó a temperatura ambiente durante 3 min, en tampón MOPS-KOH, 0,1 M, pH 7,5 y los compuestos indicados. La actividad se ensayó, añadiendo sobre la mezcla de incubación los reactivos necesarios para iniciar la reacción (ver II.C.1.1.). La actividad del control es la del ensayo estándar sin incubación previa. Se realizó un control para cada una de las adiciones extrañas a la mezcla de ensayo estándar. Las concentraciones no indicadas fueron: NADPH, 0,12 mM; NADH, 0,1 mM y NADP⁺, 10 μ M.

Tabla XIII

RELACION DE COMPUESTOS CUYA INCAPACIDAD PARA PROTEGER DE LA
INACTIVACION POR NADPH HA SIDO PROBADA

Compuesto	Concentración (mM)	Compuesto	Concentración (mM)
Oxalacetato	4	EDTA	2
Piruvato	20	Fe(III)-EDTA	10
Glutamina	10	Tiourea	2
DTE	2 y 4,5	Manitol	20
Glutation-SH	2	Formiato	20
Cisteina	2	Catalasa	(600 U)

Condiciones experimentales como en la tabla XII. El Fe(III)-EDTA se preparó mezclando cantidades equimoleculares de FeSO_4 y ED^- TA (ácido libre) y burbujeando aire a través de la solución durante 16 horas.

enzima hacia el nucleótido reducido difosforilado para actuar en la catálisis. No resulta arriesgado concluir que el efecto inactivador del NADPH tiene lugar en (ó a través de) el sitio activo de la enzima. Esta conclusión se ve apoyada también, en los resultados que se describen en el apartado siguiente.

Durante la incubación con NADPH, se forma una cantidad pequeña (10 μ M) de NADP⁺. Si se incubaba la enzima con esta cantidad de NADP⁺ en ausencia de NADPH, no ocurre nada.

III.H.2.2. *Protección*

En vista del efecto protector del α -cetogluturato, se investigó si éste podría ser sustituido por otros cetoácidos. Como se muestra en la Tabla XIII ni el oxalacetato, ni el piruvato tienen efecto protector en absoluto. Este resultado es también indicativo de la implicación del centro activo de la enzima en el proceso de inactivación.

En las Tablas XII y XIII se puede ver también, que de todos los compuestos ensayados, además del α -cetogluturato, únicamente el glutamato y el ascorbato protegen de la inactivación. El efecto de este último no deja de ser sorprendente y se discutirá más adelante.

Llobell *et al.* (1978) habían descrito la inactivación de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por NADH y MV en presencia de O₂ a tensión baja, utilizando preparaciones

parecidas a las nuestras. En su caso conseguían reactivar a la enzima con DTE, lo que hacía pensar que la inactivación tenía lugar mediante oxidación de algún grupo -SH necesario para la actividad catalítica de la nitrato reductasa. La inactivación descrita aquí podría tener lugar por un mecanismo parecido, en cuyo caso debería revertirse con DTE y probablemente protegerse con reactivos que mantengan los grupos sulfhidrilos reducidos. La primera posibilidad se discutirá más adelante (II.H.2.4.). En cuanto a la segunda, se probaron DTE, glutation reducido y cisteína (Tabla XIII). Ninguno fué capaz de proteger a las concentraciones ensayadas.

La posibilidad de que la inactivación tenga lugar mediante un proceso catalizado por algún metal presente en la mezcla de incubación, queda descartada pues el EDTA no protege.

Aunque no figura en la Tabla XII, hemos observado que el ión cloruro, si está presente durante la incubación con NADPH, protege de la inactivación. Esta protección es dependiente de la concentración del ión, siendo total a 1 M y muy notoria alrededor de 0,1 M.

III.H.2.3. *¿Participación de radicales de oxígeno?*

Geary y Meister (1976) y Mantsala y Zalkin (1976) habían descrito la inactivación por NADPH de la glutamato sintasa de *E. coli*, si bien era necesario un tiempo de incubación más largo (unos 30 min) que el observado aquí. En su ca-

Tabla XIV

INACTIVACION DE LA GLUTAMATO SINTASA POR H_2O_2 Y REVERSION POR DTE

Adición	Actividad (%)	
	-	+DTE
Ninguna	100	107
H_2O_2 , 4 mM	24	92

La enzima (0,1 mg) se incubó a temperatura ambiente en un volumen de 0,8 ml en tampón MOPS-KOH, 0,2 M pH 7,5 con y sin H_2O_2 a la concentración indicada. Al cabo de 3,5 min se añadió catalasa (650 U) y se esperó 1 min hasta que se agotó el H_2O_2 . A continuación se añadieron los reactivos (α -cetoglutarato, glutamina y NADPH) para iniciar la reacción ó bien se añadió DTE (5 μ moles), en cuyo caso se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min, transcurridos los cuales se añadieron los reactivos para iniciar la reacción. Se hicieron los oportunos controles para corregir cualquier interferencia en el ensayo.

so, la inactivación no tenía lugar en presencia de catalasa, por lo que postularon un mecanismo basado en la acción del peróxido de hidrógeno que se formaría al oxidarse por oxígeno la flavina reducida por NADPH. Esto nos llevó a considerar que el fenómeno observado en nuestro caso, podría seguir un mecanismo del mismo tipo.

III.H.2.3.1. *Inactivación por H₂O₂*

Cuando se incubaba la enzima con peróxido de hidrógeno (Tabla XIV), a concentración 4 mM, se produce una inactivación comparable en magnitud, a la producida por NADPH. Así pues, la enzima es sensible a la acción oxidante del peróxido de hidrógeno, al igual que la enzima de *E. coli*.

III.H.2.3.2. *Efecto de compuestos captadores de radicales de oxígeno y de la catalasa*

Como se puede observar en la Tabla XIII, la catalasa no tiene efecto protector alguno frente a la inactivación producida por NADPH. Esto descarta la participación de peróxido de hidrógeno en el proceso a diferencia de lo que ocurre en los casos citados anteriormente (III.H.2.3.).

(1) Ascorbato, tiourea, manitol, formiato y el complejo Fe (III)-EDTA pueden reaccionar con ciertos radicales de

(1) Los razonamientos y afirmaciones que se presentan a continuación están de acuerdo con Michelson *et al.* (1977).

oxígeno tales como $\cdot\text{OH}$ y O_2^- y con el estado singlete $^1\text{O}_2$. Si la inactivación que estamos describiendo tuviera lugar mediante la acción de alguno de estos radicales, la inclusión de cualquiera de los compuestos mencionados, en la mezcla de incubación, debería evitar o disminuir la inactivación. Los resultados indican que sólo el ascorbato es capaz de proteger en cierto grado contra la inactivación de la glutamato sintasa por NADPH.

La ineficacia de manitol, tiourea y formiato, indica que la inactivación difícilmente puede deberse a la acción de un radical del tipo del hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

El ascorbato puede reaccionar con los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) así como con el estado singlete del oxígeno ($^1\text{O}_2$). El complejo Fe-EDTA cataliza la reacción de dismutación del radical (O_2^-) dando O_2 . Por tanto, ambos deben evitar la inactivación, en el supuesto que éste tenga lugar por acción de O_2^- . Los resultados indican que el primero protege en cierto grado, mientras que el segundo no tiene ningún efecto. Con el fin de elucidar la cuestión, se llevó a cabo el experimento que se describe en el apartado siguiente.

III.H.2.3.3. *Anaerobiosis*

Si en la inactivación participa algún radical de oxígeno, este compuesto debe ser necesario para que aquélla tenga lugar. En la Tabla XV se presentan los resultados de

Tabla XV

INACTIVACION POR NADPH EN ANAEROBIOSIS

Tratamiento	Actividad (%)
Ninguno	100
NADPH	12
" más α -cetoglutarato	54

A una cubeta anaeróbica conteniendo tampón MOPS-KOH, 0,2 M pH 7,5, glucosa oxidasa, 0,2 mg y catalasa, 0,2 mg, en un volumen de 1,4 ml, se añadió 50 μ l de una solución 1 M de glucosa. Tras esperar 1 min se añadió la enzima (50 μ l; 6,7 mg/ml) ó NADPH (50 μ l; 6 mM) y luego la enzima ó bien NADPH y α -KG (100 μ l; 0,2 M) y luego la enzima. Se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se añadió el/los componente(s) de la mezcla de ensayo que faltaba(n) para iniciar la reacción. Todas las soluciones se hicieron anaeróbicas según se indica en II.D.7. El 100% de actividad corresponde una velocidad 29 nmoles de NADPH oxidados/min.

un experimento en el que se incubó la enzima con NADPH en con diciones anaeróbicas. Se observa que la inactivación sigue te niendo lugar, lo que demuestra su independencia del oxígeno. Incluso parece ser que en anaerobiosis, el efecto del NADPH es más acusado, al tiempo que el α -cetoglutarato es menos efectivo en su acción protectora.

Estos resultados invalidan la explicación del efecto protector del ascorbato basada en su reactividad con los radicales de oxígeno y excluyen toda posibilidad de inter vención de esta u otras especies de O_2 .

III.H.2.4. *Reversión*

En la Tabla XVI, se presentan resultados en los que se puso de manifiesto que la inactivación producida por NADPH, se puede revertir con DTE. Lo mismo ocurre con la inactivación producida por H_2O_2 (Tabla XIV). Es de destacar la ineficacia del α -cetoglutarato para revertir si se compara con su efectividad como protector de la inactivación (III.H.2.2.).

La nitrato reductasa dependiente de NADH de algas y de plantas superiores se inactiva también por incubación con NADH y se reactiva con ferricianuro (Losada, 1974). Por ello, para comprobar si en nuestro caso ocurría lo mismo se trató de revertir con ferricianuro. Como se observa en la Tabla XVI, este compuesto no sólo no revierte sino que él, por sí solo, puede producir una inactivación consi-

Tabla XVI

EFFECTO DE DIVERSOS TRATAMIENTOS SOBRE LA ENZIMA NATIVA Y SOBRE
LA ENZIMA INACTIVADA CON NADPH

Tratamiento I	Activ.(%)	Tratamiento II	Activ.(%)
Ninguno	100	Nada	100
		α -KG	93
		Ferricianuro	28
		DTE	120
NADPH	18	Nada	6
		Diálisis	14
		α -KG	7
		Ferricianuro	11
		DTE(a)	69
		DTE(b)	56

(a) Se eliminó previamente el NADPH con ferricianuro 0,1 mM (3-4 min).

(b) El NADPH se eliminó por diálisis.

Tratamiento I: La enzima (57 μ g/ml; activ. especif., 256 mU/mg) se incubó a temperatura ambiente durante 3 min, en tampón MOPS-KOH 0,2 M pH 7,5 y, donde se indica, con NADPH, 50 μ M.

Tratamiento II: La enzima sometida al tratamiento I se incubó inmediatamente después, durante 60-65 min y a temperatura ambiente, con los compuestos indicados, a las siguientes concentraciones: α -cetoglutarato, 10 mM; Ferricianuro potásico, 50 μ M y DTE, 5 mM. La diálisis se llevó a cabo pasando la enzima por una columna de Sephadex G-25 (a 4°C), inmediatamente después del Tratamiento I.

La actividad se media añadiendo glutamina, NADPH y, en su caso, α -cetoglutarato, sobre la mezcla de incubación. Se hicieron controles para ver el efecto de cada compuesto ajeno a la mezcla de reacción estándar, sobre el ensayo normal de actividad.

derable.

La reversión por DTE sólo tiene lugar apreciablemente si se elimina antes el NADPH. Esto concuerda con su incapacidad como agente protector de la inactivación (III.H.2.2.) y se asemeja al caso descrito por Llobell *et al.* (1978) para la nitrato reductasa de *A. chroococcum*.

La inactivación supone también una modificación permanente de la enzima, pues la simple eliminación del agente inactivante por diálisis, no basta para que el efecto se contrarreste.

Cuando el causante de la disminución de actividad es el peróxido de hidrógeno añadido como tal, el DTE también actúa eficazmente como agente reversor.

III.H.2.5. *Dependencia de la concentración de NADPH*

De los experimentos encaminados a determinar la concentración mínima de NADPH para producir la inactivación (con una concentración de enzima de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$; activ. específica, 200 mU/mg) resultó que, en un rango de concentración de NADPH desde 0,1 μM hasta 150 μM , apenas se observaban diferencias en el grado de inactivación, siendo éste siempre superior al 70%, en 3 min de incubación.

III.H.2.6. *Influencia del tiempo de incubación*

En vista de los resultados obtenidos en el expe-

rimento descrito en el apartado anterior, se procedió a reducir el tiempo de incubación con el fin de observar la dependencia del grado de inactivación respecto de este parámetro. Se ensayaron tiempos comprendidos entre 20 y 180 segundos, con una concentración de NADPH, 3 μ M y la misma concentración de enzima que en el experimento anterior. El resultado fué que a los 20 segundos (aprox.) la actividad había descendido ya hasta el 60% (40% de inactivación).

III.H.2.7. *Influencia de la concentración de proteína*

Quedaba por ver el efecto de la variación de otro parámetro importante: la concentración de proteína. Cuando ésta variaba en un rango de un orden de magnitud, con varias concentraciones de NADPH, el grado de inactivación, incubando 3 min, disminuía a medida que la concentración de proteína aumentaba. Un caso parecido ha sido observado en la glutaminasa de riñón y cerebro de cerdo (Kvamme y Torgner, 1974): La activación de la enzima por acetil-CoA y fosfato es independiente del tiempo cuando la concentración de proteína es baja.

A concentraciones determinadas de proteína, una variación de la concentración de NADPH sí afecta al grado de inactivación.

Con el fin de poner de manifiesto cuál de los dos factores es más importante desde el punto de vista del grado de inactivación obtenido, si la concentración de NADPH o la de proteína, se realizó el experimento cuyos resultados se

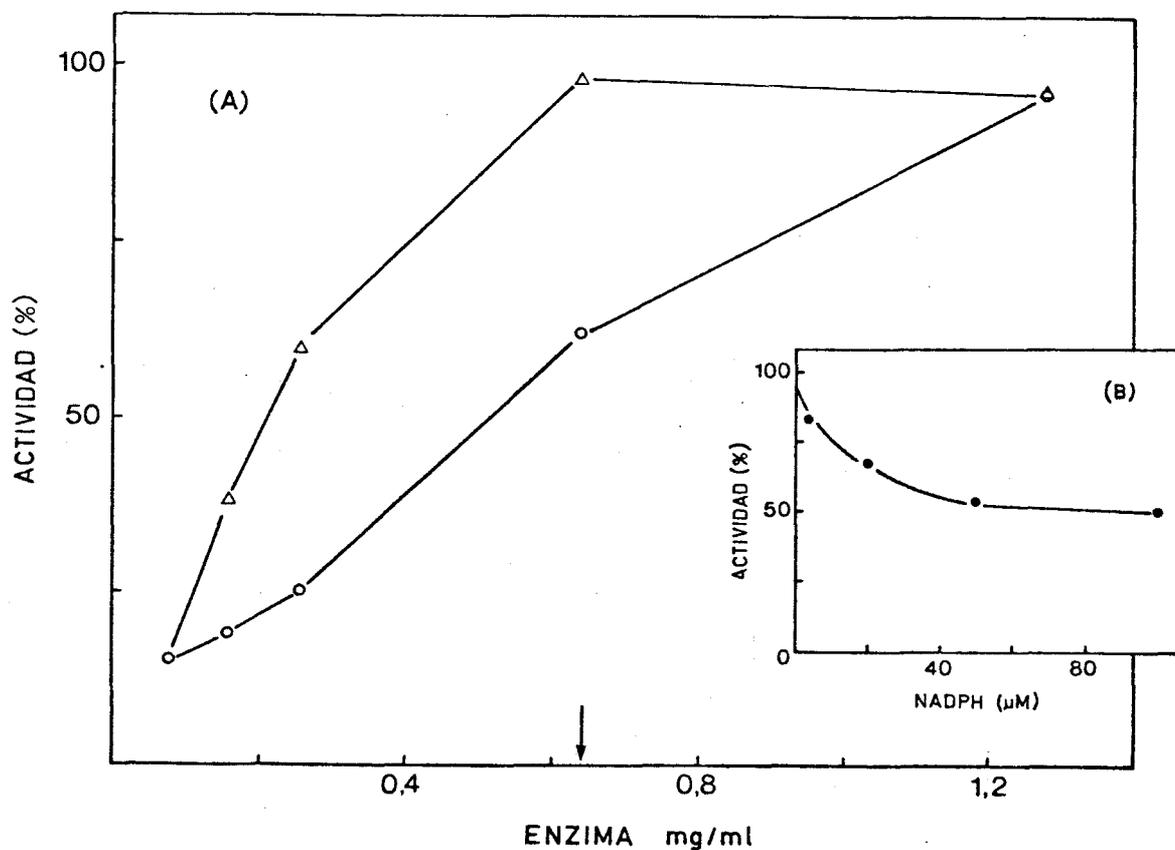


FIG. 10. Efecto de la incubación de la glutamato sintasa con NADPH, sobre su actividad, a distintas concentraciones de enzima manteniendo constante la relación $\{NADPH\}/\{Enz.\}$. (a) 0,13 mg de enzima se incubaron con 21 nmoles (○—○) ó 0,8 nmoles (Δ—Δ) de NADPH en volúmenes variables de tampón MOPS-KOH, 0,2 M, pH 7,5. A los 3 min de incubación se tomó una fracción alícuota adecuada para ensayar la actividad. (b) 0,13 mg de enzima se incubaron con una cantidad variable de NADPH, en un volumen de 0,2 ml y en las mismas condiciones que en (a). La actividad se determinó en fracciones alícuotas de 0,1 ml. La flecha indica la concentración de proteína que se empleó en el experimento de la figura (b).

reflejan en la Figura 10 (A). Se incubó la enzima durante 3 min con NADPH variando las concentraciones de ambos de forma que la relación entre ellas se mantuviera constante. Se ensayó para dos relaciones bien diferentes: 6 y 180 nmoles NADPH/mg de proteína. Se puede observar que a concentraciones altas de proteína prácticamente no hay inactivación, cualquiera que sea la concentración de NADPH, mientras que si la concentración de proteína es "intermedia", se manifiesta la dependencia del grado de inactivación respecto de la concentración de NADPH (Fig. 10 (B)).

A concentraciones más bajas de proteína, ocurre lo que se ha descrito en el apartado III.H.2.5.

III.H.2.8. *Cinética*

En la Fig. 11 se muestra el curso del proceso de inactivación durante 1 hora de incubación, a pH 7,5. La solución "stock" de enzima estaba a pH 6,5. Se observa que tras la dilución de la enzima en el tampón a pH 7,5 hay una pérdida inmediata de actividad (20%), seguida de una lenta inactivación (15% en una hora). Cuando hay NADPH presente, tiene lugar la inactivación descrita en los apartados anteriores. Si además de NADPH hay α -cetoglutarato, la pérdida de actividad por dilución es más lenta y la causada por el piridín-nucleótido reducido no tiene lugar. También se puede observar en esta figura, que la protección por glutamato descrita en III.H.2.2. tiene lugar durante los primeros mi-

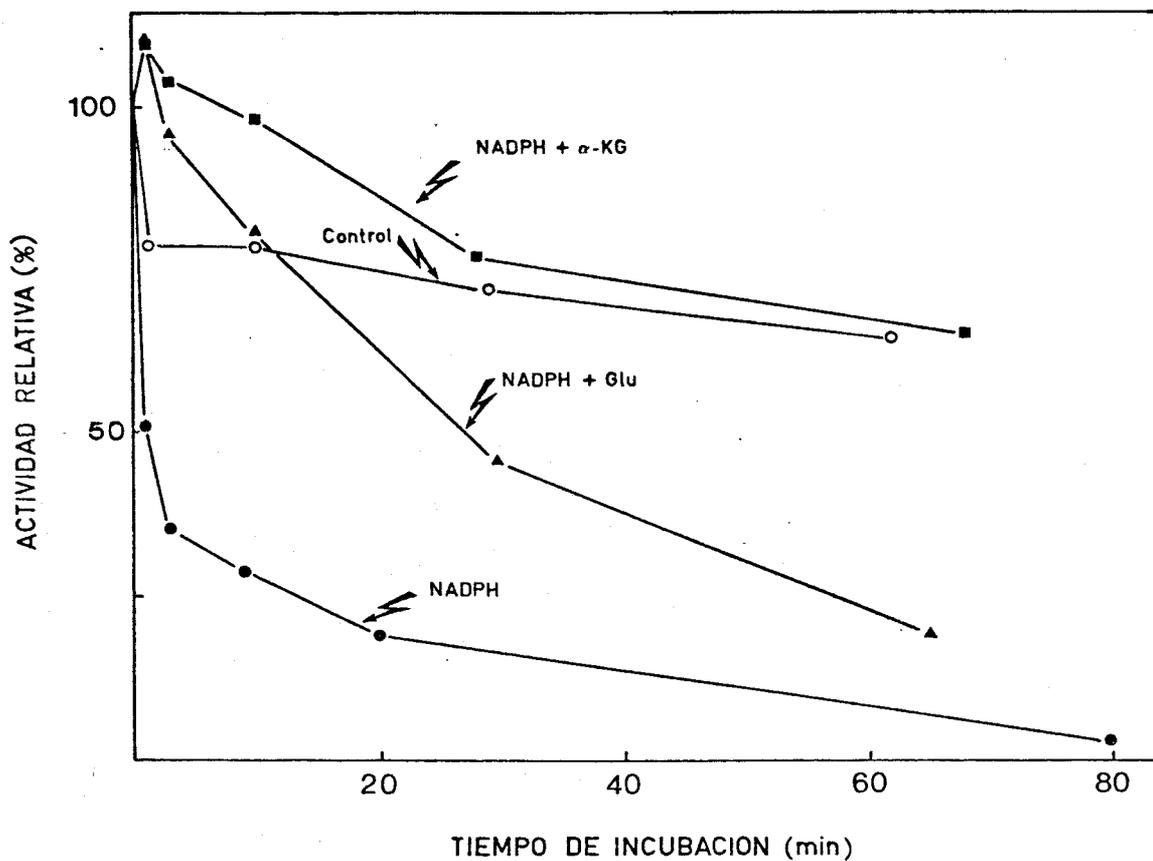


FIG. 11. Actividad de la glutamato sintasa a lo largo del tiempo cuando se incuba en distintas condiciones. La enzima se incubó a temperatura ambiente en tampón MOPS-KOH, 0,2 M, pH 7,5 sin ninguna adición, (O—O); con NADPH, (●—●); con NADPH y α -cetoglutarato, (■—■); ó con NADPH y glutamato, (▲—▲), en un volumen de 1,25 ml. A los tiempos indicados se tomaron muestras de 0,2 ml para ensayar la actividad. En la mezcla de ensayo para la enzima incubada en presencia de NADPH, no se añadió este compuesto, ya que en la fracción alícuota había suficiente (0,11-0,12 μ moles), incluso al cabo de 1 h de incubación. Las cantidades en la mezcla de incubación fueron, en μ moles: NADPH, 0,6; α -KG, 8; Glu, 8 y preparación enzimática, 0,6 mg.

nutos. Realmente, lo que hace el glutamato es retardar el proceso de inactivación.

IV. DISCUSSION

IV.A. "GS/GOGAT". UNICA RUTA PARA LA ASIMILACION DE AMONIO EN

A. chroococcum

En la primera parte de este trabajo, se presentan resultados (Tabla I) mediante los cuales se demuestra la inexistencia de glutamato deshidrogenasa en extractos crudos de *A. chroococcum*, procedentes de células cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. Los extractos crudos obtenidos no poseen la capacidad de catalizar la aminación reductiva de α -ceto-glutarato dependiente de NADH o NADPH a pH 7,5, incluso a concentraciones considerablemente altas de amonio (50 mM). Tampoco fueron capaces de catalizar la desaminación oxidativa de glutamato dependiente de NAD^+ ó NADP^+ , tanto a pH 6,5 como a pH 9,0. Las condiciones de ensayo utilizadas pueden considerarse exhaustivas con vistas a la detección de cualquier enzima con las características catalíticas de las glutamato deshidrogenasas descritas ampliamente hasta la fecha, tanto en microorganismos como en organismos superiores (Goldin y Frieden, 1971).

Drozd *et al.* (1972) han estudiado el efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre ciertos parámetros fisiológicos de *A. chroococcum* (NCIB 8003), incluyendo niveles de actividad de las enzimas responsables de la asimilación de amonio, y han encontrado actividades glutamato deshidrogenasa y glutamato sintasa dependientes de NADPH, en extractos acelulares procedentes de células cultivadas en KNO_3 , NH_4Cl ó N_2 como fuente de nitrógeno. Las variaciones en la actividad es-

pecífica de ambas enzimas eran mínimas de un medio a otro y sus niveles prácticamente idénticos. Estos autores empleaban la técnica de "cultivo continuo", y las concentraciones de NH_4Cl y KNO_3 que utilizaron fueron 3,7 y 2,1 mM, respectivamente.

Es de destacar la falta de información suministrada en relación con estos experimentos (para poder establecer alguna comparación con nuestros resultados, diametralmente opuestos a los suyos), así como el escaso hincapié que hacen en los mismos a pesar de que, en la época en que fueron realizados, la polémica en torno al papel de la GDH en el proceso de asimilación del amonio estaba al rojo vivo, tras los recientes hallazgos de Tempest *et al.* (1970).

Nosotros pensamos que si *A. chroococcum* fuera capaz de sintetizar una glutamato deshidrogenasa tan activa como la descrita por Drozd *et al.* (1972) en las condiciones de crecimiento por ellos utilizadas, debería haberse hecho patente en nuestro trabajo, cuando menos en cantidades mínimamente detectables y aunque las condiciones de ensayo no hubieran sido las óptimas. Incluso teniendo en cuenta que los microorganismos pueden ser de cepas distintas, una diferencia tan acusada referente a una enzima tan importante en el metabolismo como la GDH, no resulta compatible con otras similitudes en otros aspectos.

El glutamato es absorbido con dificultad por *E. coli* (Senior, 1975) a pesar de lo cual, es capaz de inducir

la síntesis de glutamato deshidrogenasa en este microorganismo. Según Drozd *et al.* (1972), este compuesto, al igual que la glutamina o el aspartato, no sirve como fuente de nitrógeno a *A. chroococcum* porque las células no lo pueden absorber y, por tanto, no es metabolizado cuando se añade al medio de cultivo. Ello es la causa, según los mismos autores, de que el glutamato no reprima la síntesis de la nitrogenasa cuando se añade al medio. A pesar de todo ello y en vista de las discrepancias entre nuestros resultados y los de Drozd *et al.* mencionados anteriormente, nosotros añadimos glutamato al medio de cultivo, como un intento último de inducción de la glutamato deshidrogenasa. El resultado fué negativo como se puede observar en la Tabla I y los niveles de glutamato sintasa y de glutamina sintetasa fueron idénticos a los de células creciendo a expensas de dinitrógeno.

En *Rhodospirillum rubrum*, que sí puede crecer con glutamato como única fuente de nitrógeno, este aminoácido no reprime la síntesis ni inactiva a la nitrogenasa (Neilson y Nordlund, 1975).

No resulta pues, muy arriesgado concluir que en nuestro caso, las células en vez de utilizar el glutamato presente, lo que hacen es fijar el nitrógeno del aire.

Los resultados obtenidos por nosotros indican que la glutamato sintasa de *A. chroococcum* no sufre alteraciones drásticas en función de la fuente de nitrógeno disponible. En general, se sabe muy poco sobre la regulación de la síntesis

sis de glutamato sintasa. Hasta la fecha, los resultados presentados por distintos autores son muy diversos y en algunos casos contradictorios. El empleo de la técnica de cultivo con tínuo, que ha resultado en muchos casos de sumo interés, apre ciándose por ejemplo, variaciones en el nivel de algunas enzi mas dependiendo de la etapa y de la velocidad de crecimiento, ha permitido conocer que uno de los factores que regulan la síntesis de glutamato sintasa es el contenido interno en glutamato y glutamina (Tyler, 1978).

De los resultados presentados en la Tabla I, la única conclusión que puede sacarse referente a la glutamato sintasa es que su nivel guarda relación inversa con el valor de la proporción entre la actividad $GS(Mg^{2+})$ y la actividad $GS(Mn^{2+})$. Si en *A. chroococcum*, como en *A. vinelandii* (Kleinschmidt y Kleiner, 1978) y las demás bacterias Gram-negativas analizadas por Tronick *et al.* (1973), funciona el sistema de adenilación/desadenilación para regular la actividad de la glutamina sintetasa (Wulff *et al.*, 1967 y Kingdon *et al.*, 1967), se puede decir que el nivel de glutamato sintasa es menor en células cuya glutamina sintetasa está desadenilada, que en células en las que el estado de adenilación de su glutamina sintetasa es alto.

De acuerdo con el esquema actual, basado fundamentalmente en las investigaciones con *K. aerogenes* (Magasanik *et al.*, 1974 y Magasanik, 1977), la glutamina sintetasa desadenilada es un efector positivo para la transcripción de varios operones implicados en el metabolismo del nitrógeno: ac

tiva la síntesis de las enzimas responsables de la utilización de histidina (Tyler *et al.*, 1974), prolina (Prival y Magasanik, 1974), arginina (Friedrich y Magasanik, 1978), putrescina (Magasanik, 1977), urea (Friedrich y Magasanik, 1977), asparragina (Resnick y Magasanik, 1976) y nitrógeno molecular (Tubb, 1974; Streicher *et al.*, 1974; Shanmugam *et al.*, 1975 y Gauthier y Elmerich, 1977) y reprime la síntesis de GDH (Brenchley *et al.*, 1973). La glutamina sintetasa en estado adenilado no tiene ninguno de estos efectos mencionados (Tyler *et al.*, 1974).

El NO_3^- y el NH_4^+ en *A. chroococcum* (Drozd *et al.*, 1972) y el NH_4^+ en *A. vinelandii* (Kleiner, 1975) reprimen la síntesis de nitrogenasa.

A la luz de todos estos hechos, los niveles enzimáticos encontrados por nosotros en células de *A. chroococcum* cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno (Tabla I) po-drían explicarse asumiendo que la glutamina sintetasa desadenilada (con N_2 como fuente de nitrógeno) reprime la síntesis de glutamato sintasa (en nuestro caso hasta un 60%), de la misma forma que reprime la síntesis de glutamato deshidrogenasa en *K. aerogenes*.

Cuando el amonio es abundante, la cantidad de glutamina sintetasa total es muy elevada, en comparación con la cantidad encontrada con N_2 y con NO_3^- , pero la proporción de enzima catalíticamente significativa (desadenilada) es muy baja. Aquí pueden tener lugar dos fenómenos antagónicos:

1. De acuerdo con Schutt y Holzer (1972), el amonio sería rápidamente convertido en glutamina a partir de glutamato y ATP; esta glutamina provocaría la inactivación de la GS por estimulación de la adeniltransferasa (Mecke *et al.*, 1966). Con ello se evita la acumulación en cantidad elevada, de glutamina y un gasto excesivo de ATP.

2. Por otro lado, según Kleiner (1975), la GS podría desempeñar algún papel importante en el transporte del amonio hacia el interior de la célula, bien directamente o bien de forma indirecta mediante la inducción de alguna(s) permeasa(s) específica(s). En cualquier caso, esta multifuncionalidad de la glutamina sintetasa requeriría un nivel alto de la proteína en la célula.

El funcionamiento simultáneo de estas dos tendencias contrapuestas daría como resultado una situación de compromiso entre ambas, esto es, una cantidad elevada de glutamina sintetasa y un alto grado de adenilación. Tal es el resultado obtenido por nosotros (Tabla I) y por Kleiner (1978) en *A. vinelandii*.

Para el nitrato no sería necesario un sistema de transporte tan dependiente de la GS y la cantidad total de la enzima no sería tan elevada como con amonio.

Lo dicho hasta aquí constituye una hipótesis de trabajo muy interesante para posteriores estudios.

Algo que resulta evidente, a juzgar por nuestros

resultados es que en *A. chroococcum* la única ruta metabólica posible para la síntesis de glutamato a partir de amonio es la que se conoce como "GS/GOGAT", cualquiera que sea la fuente de nitrógeno disponible por las células y que la glutamato deshidrogenasa no existe.

No se puede excluir la posibilidad de que exista otra vía para la incorporación de amonio, como por ejemplo, mediante la acción de la alanina deshidrogenasa (Johansson y Gest, 1976), puesto que su presencia en los extractos acelulares de *A. chroococcum* no ha sido investigada. Pero en cualquier caso, la ruta "GS/GOGAT" sería la principal, dado el papel que desempeñan la glutamina y el glutamato en el metabolismo como precursores de compuestos nitrogenados.

IV.B. GLUTAMINA SINTETASA. SOBRE SU PURIFICACION, REGULACION Y LOCALIZACION

En los párrafos precedentes se han mencionado ya algunas de las características de la glutamina sintetasa concernientes a su papel en la regulación de la síntesis de otras enzimas y a su propia regulación química por adenilación (GS-AMP) y desadenilación. En ellos hemos asumido que en *A. chroococcum* existe este mecanismo de regulación, ya que parece ser que esta es una propiedad general de las bacterias Gram-negativas (Tronick *et al.*, 1973). No obstante, hasta tanto no se demuestre directamente, no se puede hablar con seguridad al respecto. Nosotros hemos utilizado como criterio para determinar el estado de adenilación de la GS de

A. chroococcum (todavía hipotético) la relación entre la actividad transferasa con Mg^{2+} y la actividad sin Mg^{2+} (ver INTRODUCCION), por analogía con las bacterias entéricas y con *A. vinelandii*, y únicamente con fines comparativos. Sin embargo, el hecho de que existan cambios en el comportamiento catalítico de la GS, puestos de manifiesto por variaciones en el valor de la mencionada relación, sugiere que en *A. chroococcum* la glutamina sintetasa puede existir en dos forma interconvertibles. Para obtener una prueba definitiva sería necesario purificar la enzima en los dos estados y conseguir la interconversión en un medio de reacción definido.

Nosotros hemos tanteado varios métodos para purificar la glutamina sintetasa de células de *A. chroococcum* cultivadas en nitrato. Los resultados obtenidos se presentan en III.C. y están resumidos en la Tabla II. La purificación completa no se ha conseguido aún, pero las pruebas efectuadas resultan muy prometedoras.

Recientemente, mientras nosotros llevábamos a cabo estos estudios, ha sido purificada hasta homogeneidad la glutamina sintetasa de *A. vinelandii*, mediante procedimientos muy similares a los descritos en la Tabla II, con un rendimiento del 57% y un factor de purificación de 103 (Kleinschmidt y Kleiner, 1978).

Creemos que la purificación hasta homogeneidad de la glutamina sintetasa de *A. chroococcum* y la posterior elucidación del funcionamiento o no, de un sistema regulador por

adenilación/desadenilación puede conseguirse en breve.

Los experimentos de centrifugación indicados en III.B. sugieren que la glutamina sintetasa puede estar asociada con la membrana plasmática en *A. chroococcum*. Con *K. pneumoniae* y *A. vinelandii* se han obtenido resultados semejantes (Kleinschmidt y Kleiner, 1978). Esto podría ser consecuencia de la implicación de la glutamina sintetasa en algún proceso distinto de su función catalítica y reguladora, relacionado posiblemente con la translocación de metabolitos a través de la membrana, como se ha dicho anteriormente.

No parece muy probable que la localización de la glutamina sintetasa en el sedimento de la ultracentrifugación (ver III.B.) sea debida únicamente a un alto peso molecular. Sin embargo, esta posibilidad no debe excluirse *a priori*, ya que podría encontrarse en un estado de profunda agregación. La formación de agregados de diferentes tamaños ha sido descrita por Kleinschmidt y Kleiner en la enzima de *A. vinelandii*.

Los resultados obtenidos durante la cromatografía en Bio-gel A/1,5 m, que retiene moléculas con un peso molecular inferior a $1,5 \times 10^6$ D (III.C.4.), son coincidentes con los resultados de los experimentos de ultracentrifugación.

IV.C. GLUTAMATO SINTASA

IV.C.1. Sobre su purificación

Durante la purificación de la glutamato sintasa,

en la primera precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla III) tiene lugar un fenómeno de activación que dá como resultado un rendimiento de un 200% aproximadamente. Hay 2 explicaciones posibles de este hecho: el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ejerce un efecto activador permanente sobre la enzima, distinto (aunque quizás relacionado con él) del que produce cuando se añade la sal en la mezcla de ensayo (Fig. 2), ya que el segundo desaparece al eliminar el sulfato amónico y el primero persiste después de dializar la preparación. Además la preparación II es susceptible de ser activada por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ añadido en el ensayo.

Una segunda explicación, que quizás resulta más razonable, es que la enzima se reactiva al concentrarla.

En la Tabla IV se resume una serie de experimentos encaminados a la consecución de unas condiciones óptimas en el empleo del procedimiento de cromatografía de afinidad, para la purificación de la glutamato sintasa. Interesa hacer algunos comentarios acerca de la naturaleza del fenómeno que tiene lugar durante el proceso óptimo (III.D.4.2.): la unión de la enzima al gel "Reactive-Blue-2-Sepharose Cl-6B", de acuerdo con la terminología propuesta por O'carra *et al.* (1974), debe calificarse como "adsorción no bio-específica", en contraposición a la "adsorción bio-específica" ó "bio-afinidad", dadas las características del proceso de elución, en el que no se hace uso de un "contra-ligando" que compita con el ligando inmovilizado. Aunque, en nuestro caso, mediante tanteo, se han conseguido unas condiciones que conducen a resultados convenientes desde un punto de vista práctico, no puede ga -

rantizarse *a priori*, que su uso para la purificación de la enzima de procedencia distinta, produzca los mismos resultados. Ello debido a que las propiedades fisicoquímicas de enzimas homólogas desde un punto de vista biológico, no deben corresponderse necesariamente con su bio-especificidad (O'Carra *et al.*, 1974). De hecho, esta afirmación se ha comprobado experimentalmente en el caso de la ribonucleasa A (Wilcheck y Gorecki, 1969).

Durante el proceso de concentración del conjunto de fracciones que contenían la mayor parte de la actividad tras la cromatografía en azul-sefarosa, explicado al final de la secc. III.D.4.2., se perdió casi la mitad de la enzima. No habiéndose determinado la cantidad de proteína en el conjunto de fracciones, resultó imposible comprobar si la pérdida de actividad se corresponde con una pérdida equivalente de proteína, ó si, por el contrario, la pérdida de actividad se debe a una inactivación de la enzima. Por todo ello, el rendimiento global de este paso de purificación, en el caso particular de la Tabla III, resultó ser de un 40% y la actividad específica se incrementó 4 veces solamente. En otros experimentos, el rendimiento de la cromatografía "de afinidad" en azul-sefarosa, en las mismas condiciones, fue superior (60-80%) y el factor de purificación, del orden de 8.

Para la purificación de la glutamato sintasa se han seguido tres criterios de fraccionamiento de proteínas: solubilidad en función de la fuerza iónica (sulfato amónico) y del pH; carga electrostática (cromatografía de intercambio iónico) y afinidad por gel de sefarosa con el grupo cromóforo del

azul-dextrano unido covalentemente. Además de otros criterios de separación, el que se basa en las diferencias de tamaño molecular utilizando la técnica de filtración en gel, se emplea con gran frecuencia e incluso de forma rutinaria, por su sencillez y buenos resultados, en las etapas finales de cualquier proceso de fraccionamiento. En nuestro caso, como se indica en III.D.5., los intentos de utilización de esta técnica han resultado infructuosos hasta la fecha. La causa de la desaparición de la actividad enzimática al pasar la preparación a través de una columna de Bio-Gel A/1,5 m, resulta una incógnita por el momento. Su investigación y esclarecimiento, dará seguramente una información interesante acerca de las propiedades de la glutamato sintasa de *A. chroococcum* y será el objetivo preferente de nuestros estudios inmediatos, que incluirán la utilización de la técnica de centrifugación en gradiente de densidad. A este respecto, no existe ningún precedente en la bibliografía sobre glutamato sintasas de otros organismos.

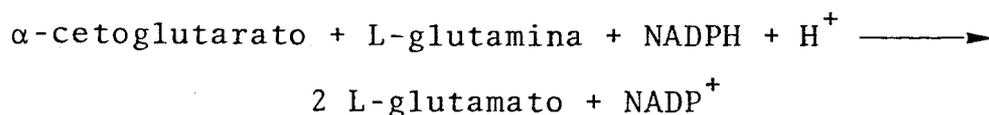
Existe la posibilidad de que durante el "tamizado molecular" se separe de la enzima algún compuesto necesario para la catálisis ó para conferir estabilidad. Otra posibilidad es que la misma enzima sufra una profunda disgregación en subunidades inactivas o muy inestables. Esta segunda hipótesis, de ser cierta, supondría una unión muy débil entre las subunidades y podría guardar relación con el hecho, ya mencionado, de que un requisito indispensable para la conservación de la actividad enzimática, es el mantenimiento de la enzima altamente concentrada.

La profundización en el estudio del comportamiento durante la filtración en gel y de las propiedades electroforéticas (ver III.B.6.) de la glutamato sintasa de *A. chroococcum*, es una tarea que se presenta tan atractiva, como áridos han resultado los trabajos de aproximación realizados hasta ahora presentados en esta Tesis.

Todo ello traerá como consecuencia la consecución de un método para purificar hasta homogeneidad la glutamato sintasa de *A. chroococcum*.

IV.C.2. Sobre sus propiedades catalíticas, cinéticas y fisi-coquímicas

La enzima cataliza la formación de 2 moles de glutamato por cada mol de NADPH oxidado (Tabla VI) en presencia de α -cetoglutarato y glutamina. En la Tabla V se presentan resultados que demuestran que el α -cetoglutarato y la glutamina, juntos, son necesarios para que la oxidación de NADPH tenga lugar (ignorando la oxidación causada por el oxígeno). Se puede deducir por tanto, que la reacción catalizada por la preparación es la de transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono alfa del α -cetoglutarato, utilizando como reductor el NADPH y resultando 2 moléculas de glutamato:



La velocidad de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima (Fig. 1).

La especificidad que presenta la enzima por sus sustratos es absoluta:

a) En cuanto a la incapacidad para utilizar el otro piridín nucleótido, parece ser una propiedad general de todas las glutamato sintetas: exceptuando las que dependen de ferredoxina como cofactor, ninguna de las enzimas dependientes de piridín nucleótidos muestra actividad con el nucleótido reducido alternativo, salvo la de suspensiones celulares de soja que utiliza indistintamente NADH y NADPH (Chiu y Shargool, 1979).

b) Tampoco, en ningún caso, se ha podido observar actividad cuando se sustituye el α -cetoglutarato por otros cetoácidos. Nosotros hemos probado oxalacetato y piruvato obteniendo los mismos resultados.

c) En cuanto a la glutamina como donador del grupo amino, la cuestión es polémica. En general, este compuesto no puede ser sustituido por ningún otro aminoácido pero sí por NH_3 en muchos casos.

En efecto, la mayoría de las amidotransferasas de glutamina puede utilizar amonio de la misma forma que glutamina. Al parecer, estas enzimas tienen sitios distintos para cada uno de estos dos sustratos y la unión de la glutamina va seguida de la transferencia de su nitrógeno amídico hasta

un sitio que puede interaccionar también con el amonio libre (Buchanan, 1973). Pero a diferencia de las demás amidotransferasas de glutamina, la glutamato sintasa que se purificó por primera vez (Miller y Stadtman, 1972, la de *E. coli* W) no podía utilizar amonio como sustrato. Sin embargo, más tarde, otros autores han encontrado actividad dependiente de NH_3 en preparaciones altamente purificadas de glutamato sintasa de *E. coli* K-12 (Mantsala y Zalkin, 1976), de *K. aerogenes* (Trotta *et al.*, 1974 y Geary y Meister, 1977), de *Thiobacillus thioparus* (Adachi y Suzuki, 1977), y de *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mantsala, 1978). La actividad con amonio era del orden de un 1-10% de la actividad dependiente de glutamina. Geary y Meister (1977) han aportado pruebas evidentes de que el mecanismo de ambas reacciones es fundamentalmente diferente, por lo que concluyen que la reacción con NH_3 no es una reacción parcial catalizada por la glutamato sintasa, sino por una entidad catalítica distinta presente en las preparaciones. Mientras tanto, Mantsala y Zalkin (1976) y Hemmila y Mantsala (1978) han presentado datos que prueban la carencia de relaciones estructurales entre la glutamato sintasa y la glutamato deshidrogenasa del mismo organismo concluyendo, por tanto, que la actividad dependiente de NH_3 no es un artefacto debido a contaminación. Además han observado que la actividad de la glutamato sintasa con NH_3 aumenta 4 veces al tratarla a pH 4,6 mientras que la GDH se inactiva durante el mismo tratamiento. Tyler (1978) opina que esta controversia se resolvería purificando la glutamato sintasa de un mutante *gdh*

que carezca de glutamato deshidrogenasa.

Nosotros hemos probado que *A. chroococcum* no tiene GDH (Tabla I) y por tanto podría ser equivalente al mutante *gdh* apuntado por Tyler. Como se observa en la Tabla V, las preparaciones de glutamato sintasa parcialmente purificada no son capaces de catalizar la oxidación de NADPH dependiente de α -cetoglutarato y amonio. Este resultado estaría de acuerdo con la idea de Geary y Meister mencionada en el párrafo anterior.

La glutamato sintasa, al igual que las demás amidotransferasas de glutamina posee actividad glutaminasa (ver III.G.1.), es decir, puede unirse a la glutamina e hidrolizar su grupo amida de forma desacoplada de la aminación, en ausencia de los demás sustratos. Esta es una reacción parcial catalizada por la glutamato sintasa de todos los organismos estudiados, excepto por la de nódulos de *Lupinus* (Boland, 1979).

La actividad glutaminasa observada por nosotros supone un 60% de la actividad "total" con NADPH y α -cetoglutarato, en preparaciones relativamente crudas y un 1,5% en preparaciones con mayor grado de pureza. Esta pérdida de actividad con el grado de purificación puede ser un reflejo de la inactivación selectiva del sitio de unión de la glutamina debido a la utilización de pH bajo en la última etapa de purificación. De hecho, Geary y Meister (1977) han observado que la actividad glutaminasa de la glutamato sintasa y de la

carbamil-fosfato sintetasa (ambas amidotransferasas de glutamina) se mantienen mejor a pH elevado, del orden de 9, que a pH neutro).

En *E. coli* y *K. aerogenes* (Geary y Meister, 1977; Mantsala y Zalkin, 1976 y Trotta *et al.*, 1974) la actividad glutaminasa supone un 2%, 10% y 9%, respectivamente sobre la actividad "total", y se encuentra en la subunidad grande, que es la que tiene la flavina, el hierro no hemínico y el sulfuro lável, aunque al parecer ninguna de estas agrupaciones tiene que ver con la hidrólisis de la glutamina.

La actividad glutaminasa encontrada por nosotros no es estimulada por α -cetoglutarato, en tanto que en *E. coli* K-12, el cetoácido estimula dicha actividad en un 60% (Mantsala y Zalkin, 1976).

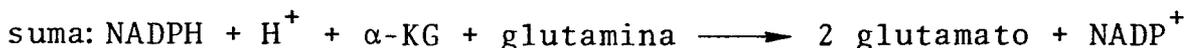
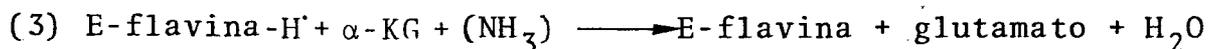
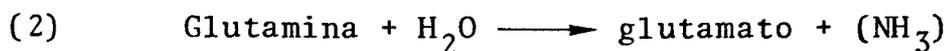
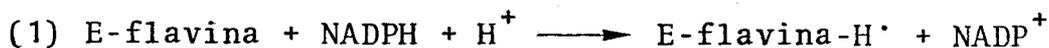
En este organismo y en *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mantsala, 1978) la actividad glutaminasa depende de la integridad funcional de un sitio activo que contiene cisteína. En la Tabla VII se presentan los resultados del tratamiento de la enzima con el reactivo de grupos tiólicos *p*-hidroximercuribenzoato. Se puede observar que este tratamiento produce la inactivación completa de las actividades glutaminasa y "total" y que este efecto puede revertirse mediante una posterior incubación con el reactivo de Cleland, DTE. Por otro lado (Tabla VIII), se observa que la glutamina proporciona una protección muy considerable (67%) frente a la inactivación por pHMB, y el glutamato en menor grado (11%).

Estos resultados sugieren que en la unión de la glutamina interviene algún grupo sulfhidrilo funcional y que la actividad glutaminasa es una reacción parcial del proceso global de transamidación.

El espectro de absorción de la glutamato sintasa indica la presencia de una agrupación flavínica (Fig. 7) y en el experimento de la Fig. 8 se demuestra que esta flavina es funcional, ya que cuando está reducida (con ditionito), se puede reoxidar con los sustratos glutamina y α -cetoglutarato juntos. Por otro lado, se ha demostrado que la enzima puede utilizar el poder reductor del ditionito en vez de NADPH en la reacción "global" (ver III.G.2.) y que el metil viológeno puede hacer de mediador en esta transferencia de electrones incrementando 3-4 veces la actividad.

Queda sin resolver la cuestión de si la flavina se reduce completamente ó si se forma una semiquinona estable. Sin embargo, Rendina y Orme-Johnson (1978), mediante estudios de resonancia de electrón paramagnético (EPR), con la enzima de *E. coli* W, han demostrado que durante la reacción con NADPH, aparece una señal muy marcada a $g = 2.00$, característica del radical semiquinónico de la flavina.

Todos estos hechos sugieren que la reacción catalizada por la glutamato sintasa es la suma de tres reacciones parciales:



Como se ha dicho más arriba, en la reacción (2) interviene algún grupo sulfhidrilo.

(NH_3) indica una "forma activa" del grupo amida de la glutamina que es transferida al carbono alfa del α -cetoglutarato y que, como se ha demostrado, no puede ser reemplazada por amonio libre, incluso cuando el poder reductor lo proporciona el ditionito (Tabla IX y secc. III.G.2.).

Los estudios sobre el efecto inactivador del NADPH, que se discuten más adelante, aportan datos que permiten una explicación más detallada de cada etapa de la reacción.

El pH óptimo de la glutamato sintasa está comprendido entre 7,5 y 8,0 (Fig. 3). Para otras glutamato sintasas, los valores de pH óptimo oscilan entre 7,3 la de *E. coli* W (Miller y Stadtman, 1972) y 8,5 la de nódulos de *Lupinus angustifolius* (Boland y Benny, 1977).

El valor de K_m para el NADPH de la glutamato sintasa de *A. chroococcum* ($\sim 4 \mu\text{M}$) es muy bajo y no difiere mucho de los valores hallados para la enzima de procedencias diversas

incluyendo plantas y levaduras, que van desde 12 μM en *K. aerogenes* (Trotta *et al.*, 1974) hasta 1,3 μM en *Lupinus* (Boland y Benny, 1977).

La enzima posee una K_m para el α -cetoglutarato de 50 μM . cuando las concentraciones de los otros sustratos son saturantes. Para la glutamina, $K_m = 176 \mu\text{M}$ en las mismas condiciones. Estos valores no pueden compararse con los obtenidos por otros autores ya que, según hemos podido comprobar nosotros, la concentración de glutamina (y probablemente de NADPH) afecta a la K_m del α -cetoglutarato y viceversa. En la bibliografía pueden encontrarse grandes diferencias en cuanto a los valores de K_m para estos dos sustratos, que pueden ser debidas, en parte, a las condiciones empleadas en cada caso.

Uno de nuestros objetivos iniciales fue la investigación del mecanismo cinético de la reacción catalizada por la glutamato sintasa, mediante el estudio de la influencia de la variación en la concentración de unos sustratos sobre los parámetros cinéticos de otros. Cuando hemos afrontado este tema nos hemos topado con varios problemas, entre los que cabe mencionar la dificultad para conseguir preparaciones suficientemente puras de glutamato sintasa y ciertos hechos no mencionados por otros autores, como, por ejemplo, la importancia del orden de adición de los componentes de la mezcla de ensayo (III.H.1.) y la influencia de ciertos iones sobre la velocidad de la reacción.

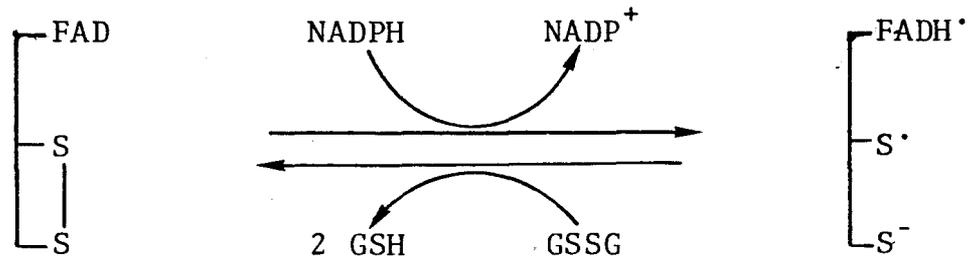
Así pues, antes de proceder al estudio de las propie

dades cinéticas de la enzima, era necesario esclarecer las anomalías de comportamiento debidas a la propia entidad proteínica (efectos de concentración y dilución; sensibilidad hacia la acción del NADPH) y al solvente, con el fin de hallar unas condiciones óptimas.

En III.E.4. y III.E.5., se describen los "efectos de tampón" y en la Fig. 2 se muestra la influencia de los aniones SO_4^{2-} y Cl^- sobre la velocidad de la reacción. Un efecto idéntico ha sido observado en la glutamato deshidrogenasa de plantas (Pahlich *et al.*, 1978) donde se ha comprobado que el Cl^- aumenta la K_m para el glutamato y para el NAD^+ . La influencia del cloruro es interesante cuando se compara con su acción protectora frente a la inactivación por NADPH que se discute a continuación.

La caracterización del efecto inactivador del NADPH se ha relatado profusamente a lo largo de la secc. III.H. y no la vamos a repetir aquí. Nosotros hemos encontrado profundas analogías entre la glutamato sintasa y la glutatión reductasa, por lo que resulta interesante comparar ambas enzimas. Con tal fin, vamos a hacer una breve descripción de la glutatión reductasa:

-Esta enzima cataliza la reducción del glutatión oxidado GSSG; contiene FAD y un disulfuro en su sitio activo y durante la catálisis el NADPH reduce el sitio activo produciendo una semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un tiol:



(Massey y Williams, 1965).

- El NADPH actuando solo, inactiva a la enzima rápidamente. El GSSG protege y los tioles (β -mercaptoetanol y GSH) protegen y revierten la inactivación (López Barea y Lee, 1979).

- Ciertos aniones influyen sobre la actividad y la estabilidad enzimática y sobre la inactivación por NADPH (Moroff y Brandt, 1973 y 1975).

- Según Moroff y Brandt (1975), la transferencia de electrones desde el NADPH al FAD de la enzima tiene lugar más lentamente cuando está unido el sustrato GSSG, que cuando el NADPH actúa solo.

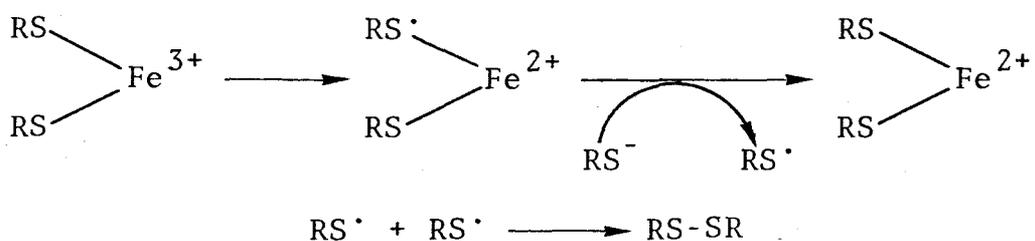
- La inactivación por NADPH va acompañada de una agregación de la enzima (Mize *et al.*, 1962; Worthington y Rosemeyer, 1975 y 1976). La explicación dada a estos hechos es la siguiente: el NADPH reduce un "sitio" en una molécula de enzima, que puede interaccionar con un "sitio" en otra molécula, bloqueándolo, es decir, el NADPH forma tioles en los sitios activos. En ausencia de GSSG, éstos pueden ser reoxidados por el aire o disulfuros. Un disulfuro anormal en el sitio activo podría ser la causa de la inactivación (López-Barea y Lee,

1979). Un tipo de anomalía podrían ser puentes disulfuro localizados intra- o intermolecularmente de forma adecuada (Worthington y Rosemeyer, 1976).

Recientemente (Williams *et al.*, 1978) se ha demostrado la validez del mecanismo de reacción propuesto por Massey y Williams (1965).

Sentado esto, nosotros podemos explicar la inactivación de la glutamato sintasa de *A. chroococcum*, la protección y reversión de la misma, en los siguientes términos:

Durante la reacción enzimática, los electrones del NADPH (ó del ditionito, en su caso) son transferidos al grupo flavínico (Fig. 8), que queda en forma semiquinónina (Rendina y Orme-Johnson, 1978) y de alguna forma los comparte con un par de átomos de azufre cercanos formándose un birradical (Williams, 1976) con S^{\cdot} , $FADH^{\cdot}$ y S^{\cdot} . Estos átomos de azufre estarían relacionados con la unión del α -KG, y en ausencia de este compuesto, podrían dar lugar a la formación de disulfuros en las proximidades del sitio activo, bloqueándolo. Esta formación de puentes disulfuro no tiene que requerir necesariamente oxígeno, ya que puede ser catalizada directamente por el Fe^{2+} (Williams, 1956; Jocelyn, 1972) de la siguiente forma:



La glutamato sintasa de *A. chroococcum* a juzgar por sus propiedades espectrales, tiene alguna forma de hierro (ver III.E.7.) que probablemente sea de tipo Fe-S como ocurre en la enzima de *E. coli* (Miller y Stadtman, 1972) y *K. aerogenes* (Trotta *et al.*, 1974) y que participa en la catálisis (Rendina y Orme-Johnson, 1978).

Parece ser que la inactivación en condiciones anaeróbicas es más profunda y el α -KG protege en menor grado (Tabla XV). Es probable que en este caso tenga lugar una sobre-reducción, pasando la flavina a su estado totalmente reducido (FADH_2) en que la enzima sería totalmente inactiva (como ocurre con la glutathion reductasa (Williams, 1976)). El mismo fenómeno aplicado además al Fe-S, provocaría una formación mucho mayor de radicales RS^\cdot . En condiciones aeróbicas, el O_2 podría actuar como captador de electrones del grupo flavínico y del Fe-S, dando H_2O y "protegiendo" frente a una inactivación mayor por sobrerreducción. De hecho, nosotros hemos observado actividad oxidasa en la fracción V (Tabla III) y Trotta *et al.* (1974) en la enzima pura.

La adición de DTE provocaría la apertura de los puentes disulfuro en la enzima inactiva, restituyendo su capacidad catalítica.

El α -cetoglutarato protegería los grupos sulfhidrilos (ó iones tiolato $-\text{S}^-$) de su sitio de unión aunque no podría evitar la sobrerreducción que ocurre en condiciones anaeróbicas (Tabla XV). El glutamato, que se forma en el

mismo sitio activo, podría interaccionar también con estos átomos de azufre protegiéndolos.

Por último, el efecto de la concentración de enzima (Fig. 10A) podría ser el reflejo de una mayor reactividad de los grupos -SH tras la dilución de la enzima. Se sabe que los grupos sulfhidrilos pueden formar uniones hidrofóbicas entre sí mediante fuerzas de Van der Waal y que estas uniones disminuyen su reactividad (Jocelyn, 1972). Se han observado cambios conformacionales en proteínas, relacionados con la reactividad de sus grupos -SH (Cecil y Snow, 1962). La dilución de la enzima debilitaría o anularía este tipo de uniones.

En cuanto al efecto del ión Cl^- , podría explicarse asumiendo que se une cerca del sitio de unión del NADPH en la enzima oxidada (como ocurre en la glutathion reductasa (Moroff y Brandt, 1975) disminuyendo la afinidad de la enzima por el NADPH (y quizás también por el α -KG) de la misma forma que ha sido descrito en la glutamato deshidrogenasa de plantas (Pahlich *et al.*, 1978).

La confirmación definitiva y la elucidación completa de este mecanismo propuesto aquí, requiere estudios más profundos sobre la unión de los sustratos y sobre los cambios conformacionales y químicos de los distintos grupos que componen la enzima, así como la formación de complejos durante el ciclo catalítico, utilizando técnicas complejas como RMN, EPR, difracción de la luz, etc.

V. CONCLUSIONES

- 1^a *Azotobacter chroococcum* no sintetiza la enzima glutamato deshidrogenasa cualquiera que sea la fuente de nitrógeno de que disponga.
- 2^a La única ruta metabólica para la síntesis de glutamato en este organismo es la que se conoce como GS/GOGAT.
- 3^a Los niveles totales de glutamina sintetasa son mayores en células cultivadas con amonio que cuando crecen con dinitrógeno o nitrato.
- 4^a Los resultados presentados aquí, sugieren que la glutamina sintetasa de *A. chroococcum* es una enzima interconvertible entre dos formas: una desadenilada, activa y otra adenilada, menos activa.
- 5^a La glutamina sintetasa de células cultivadas en dinitrógeno como única fuente nitrogenada, está completamente desadenilada, mientras que la de células cultivadas en amonio muy adenilada.
- 6^a La glutamato sintasa y la glutamina sintetasa se hallan asociadas, en cierto grado, con la membrana plasmática.
- 7^a Al pasar a través de una columna de gel de agarosa, la glutamato sintasa pierde su actividad por disociación de sus subunidades o por pérdida de algún componente indispensable para su función catalítica.

- 8^a La glutamato sintasa de *A. chroococcum* utiliza NADPH, pero no NADH, como donador de electrones. El metil viológeno reducido químicamente con ditionito y el propio ditionito pueden actuar también como donadores de electrones.
- 9^a La aminación reductiva de α -cetoglutarato con amonio libre no puede ser catalizada por la glutamato sintasa, pero sí la hidrólisis de glutamina en ausencia de los otros sustratos; en esta segunda reacción interviene(n) algun(os) grupo(s) sulfhidrilo(s).
- 10^a El espectro de absorción de la glutamato sintasa demuestra que la enzima es una flavoproteína. La flavina constituyente interviene en la reacción enzimática.
- 11^a La incubación con NADPH, en ausencia de α -cetoglutarato, durante periodos cortos de tiempo, causa la inactivación de la glutamato sintasa. El α -cetoglutarato y el glutamato protegen frente a esta inactivación, pero la glutamina no.
- 12^a Esta inactivación también tiene lugar en condiciones anaeróbicas y es reversible por ditioeritritol.
- 13^a El ion cloruro inhibe a la glutamato sintasa y también la protege de la inactivación por NADPH.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ADACHI, K. y SUZUKI, I. (1977): Purification and properties of glutamate synthase from Thiobacillus thiparus. J. Bacteriol., 129, 1173-1182.
- ANDERSON, J.W. y DONE, J. (1977): A polarographic study of glutamate synthase activity in isolated chloroplast. Plant Physiol., 60, 354-359.
- ARIMA, Y. (1978): Glutamate synthase in rice roots extracts and the regulationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. Plant Cell Physiol., 19, 955-962.
- BAILEY, J.L. (1967) en "Techniques in Protein Chemistry", 2nd. Ed., p. 340, Elsevier, Amsterdam.
- BASSHAM, J.A. y KIRK, M. (1964): Photosynthesis of amino acids. Biochem. Biophys. Acta, 90, 553-562.
- BERNT, E. y BERGMAYER, H.U. (1974) en "Methoden der Enzymatischen Analyse" (Bergmeyer, H.U. ed.); 3^a ed., pp. 1749-1753, Verlag Chemie, CmbH, Weinheim/Bergstr.
- BOLAND, M.J. y BENNY, A.G. (1977): Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur. J. Biochem., 79, 355-362.
- BOLAND, M.J. (1979): Kinetic mechanism of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur. J. Biochem., 99, 531-539.

- BRENCHLEY, J.E., PRIVAL, M.J. y MAGASANIK, B. (1973): Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem., 248, 6122-6128.
- BROWN, C.M., MAC-DONALD, D.S. y MEERS, J.L. (1974): Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Advanc. Microbiol. Physiol., 11, 1-45.
- BUCHANAN, J.M. (1973): The amidotransferases. Adv. Enzymol., 39, 91-184.
- CECIL, R. y SNOW, N.S. (1962): The reaction of normal adult human haemoglobin with heavy-metal reagents. Biochem. J., 82, 247-255.
- CHIU, J.Y. y SHARGOOL, P.D. (1979): Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. Plant Physiol., 63, 409-415.
- DOUGALL, D.K. (1974): Evidence for the presence of glutamate synthase in carrot cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 639-646.
- DROZO, J.W., TUBB, R.S. y POSTGATE, J.R. (1972): A chemostat study of the effect of fixed nitrogen sources on nitrogen fixation, membranes and free amino-acids in Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol., 73, 221-232.

- ELMERICH, C. y AUBERT, J.P. (1971): Synthesis of glutamate by a glutamine:2-oxoglutarate amidotransferase (NADP oxido reductase) in Bacillus megaterium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 371-376.
- ELY, B., AMARASHINGHE, A.B.C. y BENDER, R.A. (1978): Ammonia assimilation and glutamate formation in Caulobacter crescentus. J. Bacteriol., 133, 225-231.
- FRIEDRICH, B. y MAGASANIKI, B. (1977): Urease of Klebsiella aerogenes: control of its synthesis by glutamine synthetase. J. Bacteriol., 131, 446-452.
- FRIEDRICH, B. y MAGASANIK, B. (1978): Utilization of arginine by Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol., 133, 680-685.
- GAUTHIER, D. y ELMERICH, C. (1977): Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in Spirillum lipofenum. FEMS Microbiol. Lett., 2, 101-104.
- GEARY, L.E. y MEISTER, A. (1977): On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of α -ketoglutarate catalyzed by glutamate synthase. J. Biol. Chem., 252, 3501-3508.
- GINSBURG, A. y STADTMAN, E.R. (1973): Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. en "The enzymes of glutamine metabolism" pp. 9-43 (Prusiner, S. y Stadtman, E.R. eds.), Academic Press, N.Y.

- GOLDIN, B.R. y FRIEDEN, C. (1971): L-glutamate dehydrogenases. in Curr. Top. Cell. Regul. , vol. 4, pp. 77-117 (Horecker, B.L. y Stadtman, E.R., eds.) Academic Press, N.Y.
- GUERRERO, M.G. (1973): El sistema reductor de nitrato de Azotobacter chroococcum. Tesis Doctoral. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. y LOSADA, M.: Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Arch. Mikrobiol., 91, 287-304.
- GUERRERO, M.G. y VEGA, J.M. (1975): Molybdenum and iron as functional constituents of the enzymes of the nitrate-reducing system of Azotobacter chroococcum. Arch. Microbiol., 102, 91-94.
- HEMILA, I.A. y MANTSALA, P.I. (1978): Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from Bacillus megaterium. Biochem. J., 173, 45-52.
- HOLZER, H. y DUNTZE, W. (1971): Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 40, 345-374.
- JOCELYN, P.C. (1972): Biochemistry of the SH group. Academic Press.
- JOHANSSON, B.C. y GEST, H. (1976): Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas capsulata. J. Bacteriol., 128, 683-688.

- JOVIN, T., CHARAMBACK, A. y NAUGHTON, H.A. (1964): Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 9, 351-364.
- KINGDON, H.S., SHAPIRO, B.M. y STADTMAN, E.R. (1967): Regulation of glutamine synthetase, VIII. ATP:glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1703-1710.
- KLEINER, D. (1975): Ammonium uptake by nitrogen fixing bacteria. I. Azotobacter vinelandii. Arch. Microbiol., 104, 163-169.
- KLEINSCHMIDT, J.A. y KLEINER, D. (1978): The glutamine synthetase from Azotobacter vinelandii: purification, characterization, regulation and localization. Eur. J. Biochem., 89, 51-60.
- KVAMME, E. y TORGNER, I.Aa. (1974): The effect of acetyl-CoA on phosphate-activated glutaminase from pig kidney and brain. Biochem. J., 137, 525-530.
- LI, H.C. y BUCHANAN, J.M. (1971): Biosynthesis of the purines. XXXIII Catalytic properties of the glutamine site of formylglycinamide ribonucleotido amidotransferase from chicken liver. J. Biol. Chem., 246, 4713-4719.
- LLOBELL, A., BARCENA, A., VILA, R. y PANEQUE, A. (1978): Nitrato reductase de A. chroococcum. Inactivación reversible por poder reductor en presencia de aire. XVII Reunión de la SEB, Resúmenes, p. 60, Madrid.

- LOPEZ-BAREA, J. y LEE-C.Y. (1979): Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics and regulation. Eur. J. Biochem., 98, 487-499.
- LOSADA, M. (1974): Interconversion of nitrate and nitrite reductases of the assimilatory type. en "Metabolic Interconversion of Enzymes", pp. 257-270 (Fisher, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H. y Stadtman, E.R., eds.), Springer Verlag, Berlin.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- LUDWIG, R.A. (1978): Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32H1. J. Bacteriol., 135, 114-123.
- MAGASANIK, B. (1977): Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. Trends Biochem. Sci., 2, 9-12.
- MAGASANIK, B., PRIVAL, M., BRECHLEY, J., TYLER, B., DE LEO, A., STREICHER, S., BENDER, R. y PARIS, C. (1974): Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis. en "Current Topics in Cellular Regulation", vol. 8, pp. 119-138 (Horecker, B y Stadtman, E.R., eds.), Academic Press, N.Y.
- MANTSALA, P. y ZALKIN, H. (1976): Glutamate synthase. (Properties of the glutamine dependent activity). J. Biol. Chem., 251, 3294-3299.

- MASEY, V. y WILLIAMS, C.H. (1965): On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. J. Biol. Chem., 240, 4470-4480.
- MECKE, D. WULFF, K. LIESS, K. y HOLZER, H. (1966): Characterization of a glutamine synthetase inactivating enzyme from Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 452-458.
- MEERS, J.L., TEMPEST, D.W. y BROWN, C.M. (1970): Glutamine (amide):2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. J. Gen Microbiol., 64, 187-194.
- MICHELSON, A.M., McCORD, J.M. y FRIDOVICH, I. (eds.) (1977): Superoxide and superoxide dismutases. Academic Press, N.Y.
- MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1975): Glutamine and asparragine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. Biochem. J., 149, 403-409.
- MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1976): The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. TIBS, 1, 103-106.
- MILLER, R.E. y E.R. STADTMAN (1972): Glutamate synthase from E. coli (an iron-sulfide flavoprotein). J. Biol. Chem., 247, 7407-7419.
- MIZE, C.E., THOMPSON, T.E. y LANGDON, R.G. (1962): Hepatic glutation reductase. II. Physical properties and mechanism of action. J. Biol. Chem., 237, 1596-1600.

- MOROFF, G. y BRANDT, K.G. (1973): Steady-state kinetic investigation of specific anion effects on the catalytic activity of yeast glutathion reductase. Archiv. Biochem. Biophys., 159, 468-474.
- MOROFF, G. y BRANDT, K.G. (1975): Yeast glutathione reductase. Studies of the kinetics and stability of the enzyme as a function of pH and salt concentration. Biochim. Biophys. Acta, 410, 21-31.
- NACHLAS, M.M., MARGULIES, S. y SELIGMAN, A.M. (1960): Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. J. Biol. Chem., 235, 2739-2743.
- NEILSON, A.H. y NORDLUND, S. (1975): Regulation of nitrogenase synthesis in intact cells of Rhodospirillum rubrum: inactivation of nitrogen fixation by ammonia, L-glutamine and L-asparagine. J. Gen. Microbiol., 91, 53-62.
- O'CARRA, P., BARRY, S. y GRIFFIN, T. (1974): Interfering and complicating adsorption effects in bioaffinity chromatography. en "Methods Enzymol" vol. XXXIV-B, pp. 108-126 (Jakoby, W.B. y Wilchek, M., eds.), Academic Press.
- PAHLICH, E., GELLERI, B y KINDT, R. (1978): The effect of neutral salt anions on the oxidative deamination activity of plants glutamate dehydrogenase. Planta, 138, 161-165.
- PINKUS, L.M. (1977): Glutamine binding sites. en "Methods Enzymol" vol. XLVI, pp. 414-427 (Jakoby W.B. y Wilchek, M., eds.), Academic Press.

- PRIVAL, M.J. y MAGASANIK, B. (1971): Resistance to catabolite repression of histidase and proline oxidase during nitrogen-limited growth of Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem., 246, 6288-6296.
- PRUSINER, S., MILLER, R.E. y VALENTINE, R.C. (1972): Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate control of the enzymes of glutamine metabolism in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2922-2926.
- PRUSINER, S. y STADTMAN, E.R. (ed.) (1973): The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press, N.Y.
- RESNICK, A.D. y MAGASANIK, B. (1976): L-asparaginasa of Klebsiella aerogenes. Activation of its synthesis by glutamine synthetase. J. Biol. Chem., 251, 2722-2728.
- RENDINA, R. y ORME-JONHSON, H. (1978): Glutamate synthase: on the kinetic mechanism of the enzyme from E. coli W. Biochemistry, 17, 5388-5393.
- ROBSON, R.L. (1979): Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from Azotobacter chroococcum. Biochem. J., 181, 569-575.
- ROON, R.J., EVEN, H.L. y LARIMORE, F. (1974): Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol., 118, 89-95.
- SCHUTT, H. y HOLZER, H. (1972): Biological of ammonia induced inactivation of glutamine synthetase in Escherichia coli. Eur. J. Biochem., 26, 68-72.

- SENIOR, P.J. (1975): Regulation of nitrogen metabolism in E. coli and K. aerogenes: studies with the continuous-culture technique. J. Bacteriol., 123, 407-418.
- SHANMUGAM, K.T., CHAN, I. y MORANDI, C. (1975): Regulation of nitrogen fixation. Nitrogenase-derepressed mutants of Klebsiella pneumoniae. Biochem. Biophys. Acta, 408, 101-111.
- SHAPIRO, B. y E. STADTMAN (1970): The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. Annu. Rev. Microbiol., 24, 501-524.
- SIMS, A. y FOLKES, B. (1964): A kinetic study of the assimilation of $\{^{15}\text{N}\}$ - ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of Candida utilis. Proc. Roy. Soc. B., 159, 479-502.
- STADTMAN, E.R., GINSBURG, A., CIARDI, J.E., YEH, J., MENNING, S.B. y SHAPIRO, B.M. (1970): Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactions. en "Advanc. Enzyme Regul.", 8, pp. 99-118 (Weber, G., ed.) Pergamon Press, Oxford.
- STREICHER, S.L., SHANMUGAN, K.T., AUSUBEL, F., MORANDI, C. y GOLDBERG, R.C. (1974): Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulation of nitrogenase synthesis. J. Bacteriol., 120, 815-821.

- TEMPEST, D.W., MEERS, J.L. y BROWN, C.M. (1970): Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. Biochem. J., 117, 405-407.
- TORTOLERO, M., VILA, R. y PANEQUE, A. (1975): Ferredoxing-dependent nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Plant Sci. Lett., 5, 141-145.
- TRONICK, S.R., CIARDI, J.E. y STADTMAN, E.R. (1973): Comparative biochemical and immunological studies of bacterial glutamine synthetases. J. Bacteriol., 115, 858-868.
- TROTTA, P.P., PLATZER, K.E.B., HASCHEMEYER, R.H. y MEISTER, A. (1974): Glutamine binding subsunit of glutamate synthase and parcial reactions catalyzed by this glutamine amido transferase, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4607-4611.
- TUBB, R.S. (1974): Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella*. Nature, 251, 481-485.
- TYLER, B., DE LEO, A. y MAGASANIK, B. (1974): Activation of transcription of *hut* DNA by glutamine synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 225-229.
- TYLER, B. (1978): Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem., 47, 1127-1162.
- TZAGOLOFF, A. y PENEFSKY, H.S. (1971): Extraction and purification of lipoprotein complexes from membranes. en "Methods in Enzymology", vol. XXII, pp. 219-230 (Jakoby, W.B., ed.), Academic Press, N.Y.

- VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1973):
Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-nitrite reductase
from Azotobacter chroococcum. Biochem. J., 133, 701-708.
- VILA, R., LLOBELL, A., BARCENA, J.A. y PANEQUE, A. (1978): Ni-
trate reductase from Azotobacter chroococcum. Inactivation
by oxidizing agents and reactivation with dithioerythritol.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 943-949.
- WANG, C-S y RAPER, J.R. (1970): Isozyme patterns and sexual
morphogenesis in Schizophyllum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
66, 882-889.
- WEBER, K. y OSBORN, M. (1969): The reliability of molecular
weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel
electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- WILCHEK, M. y GORECKI, M. (1969): Affinity chromatography of
bovine pancreatic ribonuclease A. Eur. J. Biochem., 11,
491-494.
- WILLIAMS, R.J. (1956): Citado por Jocelyn (1972). Chem. Rev.,
56, 299.
- WILLIAMS, C.H., Jr. (1976): Flavin containing dehydrogenases.
en "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.), pp. 89-173, Academic
Press, N.Y.

- WILLIAMS, C.H., Jr., THORPE, C. y ARSCOTT, L.D. (1978): Functional roles of the two active site cysteine residues generated on reduction of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase. en "Mechanism of oxidizing enzymes"(Singer, T.P. and Ondarza, R.N., eds.), pp. 3-16. Elsevier/North Holland.
- WORTHINGTON, D.J. y ROSEMEYER, A. (1975): Glutathione reductase from human erythrocytes. (Molecular weight, subunit composition and aggregation components). Eur. J. Biochem., 60, 459-466.
- WORTHINGTON, D.J. y ROSEMEYER, A. (1976): Glutathione reductase from human erythrocytes. (Catalytic properties and aggregation). Eur. J. Biochem., 67, 231-238.
- WULFF, K., MECKE, D. y HOLZER, H. (1967): Mechanism of the enzymatic inactivation of glutamine synthetase from E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 740-745.
- YATES, M.G. y DANIEL, R.M. (1970): Acetylene reduction with physiological electron donors by extracts and particulate fractions from nitrogen-fixing Azotobacter chroococcum. Biochem. Biophys. Acta, 197, 161-169.
- YATES, M.G. y PLANQUE, K. (1975): Nitrogenase from Azotobacter chroococcum. Purification and properties of the component proteins. Eur. J. Biochem., 60, 467-476.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de D. José Antonio Barceua Ruiz titulada "Enzimas de la asimilación del amoníaco en la bacteria Azotobacter Chacoicum", acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "cum laude".

Sevilla, de

1.9

El Vocal.

El Vocal.

El Vocal.

[Handwritten signature]

B. Valdez

[Handwritten signature]

El Presidente.

El Secretario.

El Decano.

[Handwritten signature]

Jacobo Cerdas

J. A. Miras

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672507