

9
20j-

03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
GLUTAMINA SINTETASA III DE *Rhizobium*
leguminosarum biovar *phaseoli* .**

**Tesis que para obtener
el Título de M. en IBB
p r e s e n t a**

Roberto Meza Romero

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. Asimilación de amonio en enterobacterias	1
a. papel de la glutamato deshidrogenasa	1
b. papel de la glutamato sintasa	3
c. papel de la glutamina sintetasa (GS)	4
d. regulación de la actividad de la GS	7
e. regulación a nivel de síntesis de la GS	9
2. Asimilación de amonio en <i>Rhizobium</i>	16
3. Evidencia genética y bioquímica de que existe una tercera GS en <i>Rhizobium</i>	23
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODOS	27
1. Cepas	27
2. Reactivos	28
3. Resinas	28
4. Medios de cultivo	28
5. Crecimiento de los microorganismos	28
6. Purificación de bacteroides	29
7. Ensayos enzimáticos	29
8. Purificación de la GSIII	30
9. Electroforesis	33
a. desnaturalizante	33
b. nativa	34
c. preparativa reversa	34
d. isoelectroenfoque en dos dimensiones	34
10. Inmunizaciones	35
11. Preparación de anticuerpos	35
12. Experimentos tipo Ouchterlony	36
13. Experimentos tipo Western	36
14. Determinación de la temperatura óptima de actividad	37
15. Determinación de las K_m para glutamato, hidroxilamina y ATP	37
16. Determinación de la secuencia N-terminal de la proteína	38
17. Análisis de la secuencia de DNA	38
RESULTADOS	39
1. Purificación de la GSIII	40
2. Determinación de la secuencia N-terminal	45
3. Caracterización de la enzima GSIII	45
a. temperatura de actividad óptima	45
b. actividad en geles nativos	45
c. inmunodetección	47

d. determinación del punto isoeléctrico	49
e. determinación de los valores de K_m	52
4. Análisis de la secuencia de DNA	52
5. Secuencias reguladoras alrededor de $gint$	55
6. Homología de la secuencia de aminoácidos otras GS's	56
DISCUSION	70
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	80
AGRADECIMIENTOS	95

RESUMEN

La mayoría de las Rhizobaceae expresan dos isoenzimas GS: GSI, codificada por *glnA* y GSII, codificada por *glnI*.

Recientemente se ha descrito la existencia en *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* de una secuencia, llamada *glnT*, capaz de complementar la auxotrofia para glutamina de diversas cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

En este estudio se muestra que:

La secuencia *glnT* de *R.l.phaseoli*, codifica para una glutamina sintetasa (GSIII) distinta a GSI y GSII, cuya estructura oligomérica es un dodecámero de subunidades idénticas de 51 kDa de peso molecular y 6.2 de punto isoeléctrico, termoestable durante 1h a 55 C, con actividad de sintetasa alta pero actividad de transferasa no-detectable o baja, con una temperatura óptima de actividad de 60 C.

Los anticuerpos producidos contra la enzima pura, nativa ó desnaturalizada, no muestran reacción cruzada contra la GSI ó la GSII de *R.l. phaseoli*, indicando que las tres isoenzimas son inmunológicamente distintas, y el antígeno de GSIII no está presente en extractos crudos de la cepa silvestre CE3 de *R.l.phaseoli*, ni extractos de cepas que carecen de GSI ó GSII, crecidas bajo diferentes condiciones metabólicas.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gene *glnT*, confirma la presencia de un ORF con homología a las GS's de bacterias gram-positivas y en menor grado a las de las bacterias gram-negativas. Los primeros 8 aminoácidos de la secuencia deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, coinciden con aquella obtenida por medio del método degradativo de Edman.

INTRODUCCIÓN

1. ASIMILACION DE AMONIO EN ENTEROBACTERIAS.

En bacterias entéricas, todo el nitrógeno celular se deriva directamente de la incorporación de amonio (Reitzer y Magasanik, 1987). Este es asimilado en esqueletos de carbono dando como resultado la formación de glutamato y glutamina. Estos dos aminoácidos a su vez son los donadores del nitrógeno para el resto de las macromoléculas nitrogenadas celulares: la glutamina a través de la donación de su grupo amida y el glutámico a través de su grupo amino (**figura 1**).

Las enzimas responsables de la asimilación de amonio en glutamato y glutamina son: la glutamato deshidrogenasa (GDH), la glutamato sintasa (GOGAT) y la glutamina sintetasa (GS) (Tyler, 1978).

a. Papel de la glutamato deshidrogenasa. La GDH (L-glutamato:NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.4.1.4.) cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por amonio en una reacción reversible que usa NADPH o NADH.



En muchos microorganismos, la GDH dependiente de NADH parece tener una función catabólica, mientras que las que dependen de NADPH sirven principalmente para la síntesis de glutamato (Tyler, 1978).

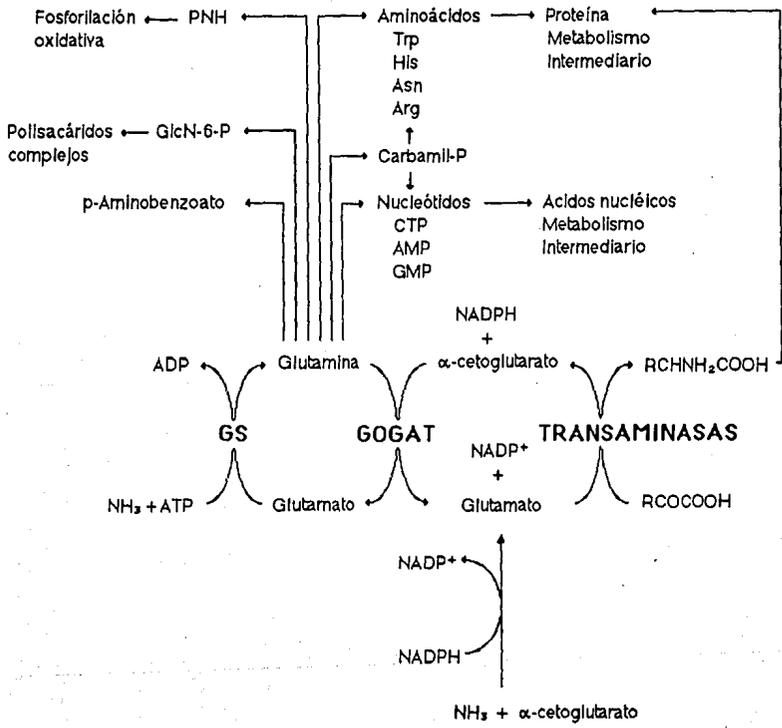


Figura 1. Vías de asimilación de amonio en enterobacterias para la producción de glutamato y glutamina y algunos de los papeles de estos compuestos en el metabolismo intermedio.

Las bacterias entéricas poseen una sola GDH dependiente de NADPH que tiene una K_m del orden de 1mM para 2-oxoglutarato y amonio, lo cual sugiere que en las células que crecen en un medio con limitación de amonio, esta enzima es relativamente inefectiva.

Mutantes de *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Salmonella typhimurium* que carecen de esta enzima no requieren glutamato para crecer, una observación consistente con la existencia de una vía alterna para la biosíntesis de glutamato a través de la glutamato sintasa.

b. Papel de la glutamato sintasa. La GOGAT (L-glutamato:NADP⁺ óxidorreductasa; EC 2.6.1.53) es una amido-transferasa que transfiere el grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato dando como resultado la formación de 2 moles de glutamato; en esta reacción se utiliza el poder reductor del NADPH.



Esta enzima fué descubierta por Tempest *et al.* en 1970 y se ha reportado en todos los procariontes examinados hasta ahora. Las cepas que carecen de actividad de GOGAT solo pueden crecer en presencia de altas concentraciones de amonio en el medio. Las K_m para glutamina y NADPH de la GOGAT de *E. coli* y *K. aerogenes* son del orden de 0.2 a 0.3 mM y 2.2 a 12 M, respectivamente (Mantzala y Zalkin, 1976; Bower y Zalkin, 1983). En *E*

coli (Rendina y Orme-Johnson, 1978) y *Klebsiella pneumoniae* la K_m para 2-oxoglutarato es de 5 M y 300 M, respectivamente.

La GOGAT de enterobacterias está compuesta de dos sub-unidades de diferente peso molecular codificadas por genes aparentemente ligados: *gltB* y *gltD* (Fuchs *et al.*, 1982). Las cepas derivadas de mutantes GDH- que tienen una lesión en unos de estos genes (*gltB*), son auxótrofas para glutamato.

La conclusión que resulta de todo esto es que, en enterobacterias, existen dos vías para la síntesis de glutamato.

Cuando cepas tipo silvestre de enterobacterias crecen en presencia de glucosa y altas concentraciones de amonio, el glutamato se forma principalmente por la actividad de GDH. Bajo estas condiciones los niveles de GS y GOGAT son bajas pero suficientes para abastecer a las células de glutamato y glutamina para la síntesis de proteínas y diversas reacciones biosintéticas. Sin embargo, cuando la cantidad de amonio disponible es limitado, el amonio se asimila por la acción concertada de la GS y de la GOGAT [Figura 2 (Magasanik, 1982)].

c. Papel de la glutamina sintetasa. La figura 1 muestra que la glutamina es un precursor importante en muchas vías biosintéticas. Proporciona el nitrógeno para la síntesis de purinas, pirimidinas, amino-azúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD y *p*-aminobenzoato y es usada intacta para la síntesis de proteínas y como una manera de almacenar amonio (Meister, 1980).

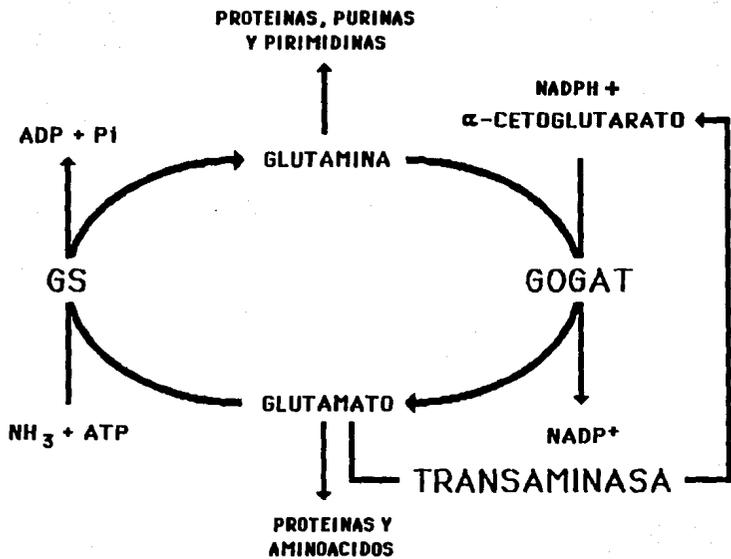


Figura 2. La GOGAT y la GS son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas acopladas.

Este aminoácido es formado por la glutamina sintetasa (GS) (L-glutamato: amonio liasa; EC 6.3.1.2.), la cual incorpora amonio en la molécula de glutamato en una reacción que requiere de ATP.

Mg²⁺

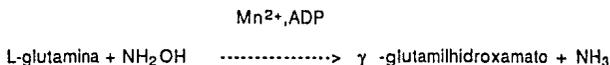


La enzima purificada es usualmente un dodecámero de subunidades idénticas de 50-55 kd de peso molecular y su actividad catalítica es regulada negativamente por la adición covalente de un grupo AMP a un residuo tirosina específico en cada una de las subunidades. La adenilación de una subunidad, inactiva esa subunidad unicamente de tal manera que existe un gradiente de actividad catalítica dependiente del grado de adenilación de la enzima.

Excepciones a la estructura de dodecámero se han encontrado en al menos dos organismos. En *Clostridium pasteurianum* (Krishnan *et al.*, 1986) un organismo capaz de fijar nitrógeno en condiciones anaeróbicas, la GS tiene una estructura oligomérica de 20 subunidades y, en *Bacteroides fragilis* (Hill, *et al.* 1989) el peso de subunidad de la GS es 82 kDa aproximadamente y la estructura oligomérica es de un hexámero.

In vitro, la actividad de glutamina sintetasa se puede medir por la reacción de transferasa y por la reacción biosintética. En ambos ensayos, el producto detectado es γ -glutamil-hidroxiato.

En la reacción de transferasa, tanto la enzima adenilada como la no adenilada cataliza la transferencia del residuo γ -glutamil de la glutamina a la hidroxilamina en presencia de ADP, Mn^{2+} , y arsenato.



As

No obstante, las dos formas de GS (la forma adenilada como la no adenilada) se pueden distinguir añadiendo 60 mM de Mg^{2+} a la mezcla de reacción. Bajo estas condiciones solo la enzima no adenilada es activa ya que la forma adenilada está completamente inhibida (Ginsburg y Stadtman, 1973). Esta propiedad permite estudiar los niveles de adenilación de la GS cuando las células crecen en diferentes condiciones metabólicas.

d. Regulación de la actividad catalítica de la GS. Debido a la importancia de la glutamina en el metabolismo celular, es de esperarse que la síntesis y actividad de la glutamina sintetasa estén altamente reguladas (Gussin *et al.*, 1986; Halpern, 1988; Magasanik, 1982; Tyler, 1978).

Existen dos niveles de regulación de la GS: 1. a nivel de actividad y a nivel de síntesis. En estos dos niveles de regulación intervienen varias proteínas lo cual amplifica la complejidad del sistema de regulación. Existen varios mecanismos de regulación de la actividad catalítica de la GS en respuesta a diferentes condiciones intracelulares: 1. por inhibición por

retroalimentación, en la que participan diferentes productos del metabolismo de la glutamina, **2.** por inactivación en respuesta a la concentración de los iones divalentes y, **3.** por modulación de la actividad por un sistema de adenilación en cascada en respuesta al balance carbono/nitrógeno intracelular.

En bacterias entéricas, el balance entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno es reflejado por los niveles intracelulares de 2-oxoglutarato/glutamina (Stadtman, *et al.* 1980). La relación de estos metabolitos controla la actividad de una enzima bifuncional, uridil-transferasa (UTasa), producto del gen *glnD*, que cataliza la uridililación y desuridililación de los residuos de tirosina de otra proteína regulatoria, P_{II}, un tetrámero de subunidades de 11kDa, producto del gen *glnB*. La proteína P_{II}, interacciona con la adenil-transferasa, ATasa, codificada a su vez por el gen *glnE* (Adler, *et al.*, 1975; Bueno *et al.*, 1985), y es una proteína bifuncional que promueve la adenilación y desadenilación de los residuos de tirosina en la posición 357 de las subunidades de la GS (Stadtman, *et al.*, 1980; Bueno *et al.*, 1985; Magasanik *et al.*, 1987; Ginsburg y Stadtman, 1973).

Cuando la concentración de 2-oxoglutarato es alta, la UTasa convierte P_{II} a P_{II}-UMP y esta interacciona con la adenililtransferasa, estimulando la reacción de desadenililación de la GS (Ginsburg y Stadtman, 1973; Stadtman *et al.*, 1980; García y Rhee, 1983). Cuando la concentración de gluta-

mina es alta, la UTasa remueve los grupos UMP de la proteína P_{II}. La P_{II} no uridilada, interacciona con la ATasa la cual cataliza la adenilación de la GS (Stadtman, *et al.*, 1980). Un esquema de este complejo circuito regulatorio se muestra en la **figura 3**.

e. Regulación a nivel de síntesis de GS. La glutamina sintetasa es el producto proteico del gen *glnA*. En enterobacterias, este gen forma parte de el operón *glnA-ntrBC* (también denominado *glnALG*) (Pahel *et al.*, 1982). Este operón tiene tres promotores: *glnAp1* y *glnAp2*, localizados hacia el extremo 5' de *glnA* y *glnLp* situado en la región intergénica de *glnA* y *ntrB* (Pahel, *et al.*, 1982; Reitzer y Magasanik, 1985) (**Figura 4**). Los promotores *glnAp1* y *glnLp* son reconocidos por la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa y tiene la secuencia de los promotores típicos de las bacterias entéricas en la posición -10 y -35 con respecto al sitio de la iniciación de la transcripción. La expresión a partir del promotor *glnAp1*, es reprimida por el producto proteico del gen *ntrC*, (NR₁) (Reitzer y Magasanik, 1985, 1986) pero activado por la combinación de AMP cíclico y CRP. Este es un promotor débil que sirve para mantener niveles de transcripción de GS en condiciones de exceso de nitrógeno y limitancia de carbono. El segundo promotor, *glnAp2*, hacia el 3' de *glnAp1*, consiste de una secuencia específica (TTGGCACAN₄TCGCT) en la posición -24 y -12 en-

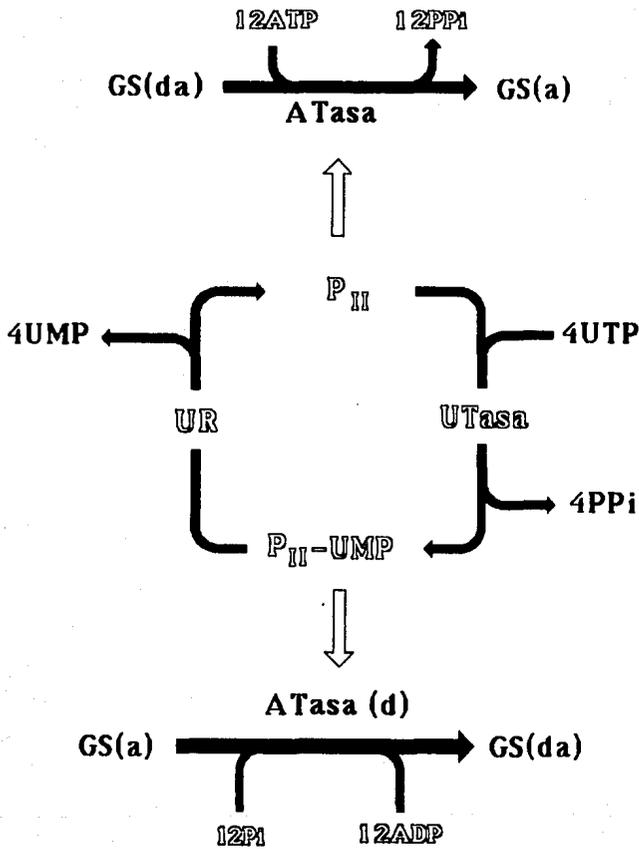


Figura 3. Mecanismo de regulación de la actividad de la GS en bacterias entéricas por el sistema de adenilación. ATasa: adeniltransferasa; UTasa: uridiltransferasa; UR: uridiltransferasa que remueve uridilos; UMP: uridin-monofosfato; UTP: uridintrifosfato; GS(a): glutamina sintetasa adenilada.

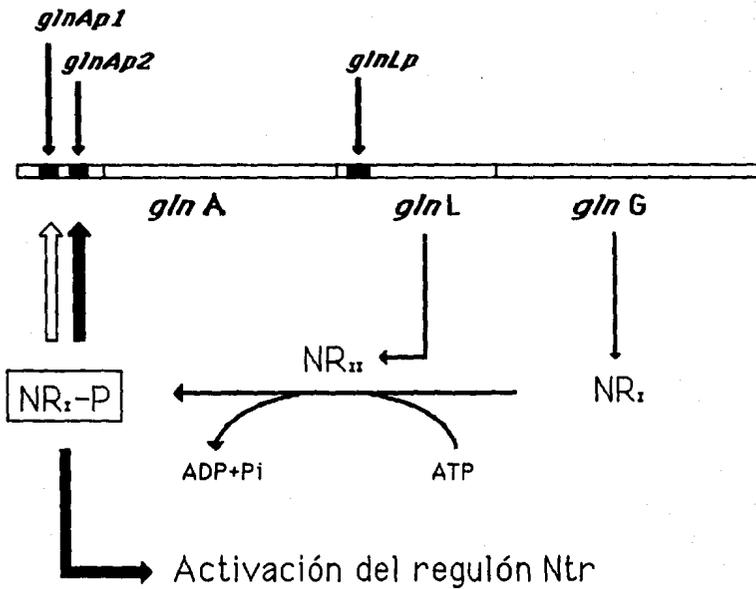


Figura 4. Organización genética del operón *glnA-gln LG* en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La flecha sólida indica regulación positiva y la flecha vacía indica regulación negativa.

contrada en los promotores regulados por el sistema Ntr. Para su expresión, requiere el producto activado del gen *ntrC* (NR_I), así como también de la subunidad σ^{54} (Reitzer y Magasanik, 1985; Sasse-Dwight y Gralla, 1988). La subunidad σ^{54} es una proteína codificada por el gen *ntrA*, también conocido como *rpoN*, o *glnF* (**figura 4**). La proteína kinasa NR_{II}, producto del gen *ntrB*, puede fosforilarse a sí misma en un residuo His a expensas de ATP y este fosfato es transferido a NR_I (Weiss y Magasanik, 1988; Keener y Kustu, 1988) en un residuo Asp situado dentro del dominio N-terminal. Como ya se mencionó, NR_I fosforilado (NR_I-P) promueve la transcripción desde *glnAp2*. NR_I-P es también defosforilado por la acción de NR_{II}. Tanto NR_I como NR_{II}, pertenecen a una gran superfamilia de sistemas regulatorios de dos componentes que intervienen en la captación y transducción de señales (Albright, *et al.*, 1989).

La actividad de la proteína NR_{II} está a su vez regulada por P_{II}. El estado nitrogenado de la célula es detectado por la UTasa, la cual transfiere un grupo UMP a P_{II} dando como resultado P_{II}-UMP, probablemente en respuesta a una alta proporción de glutamina/2-oxoglutarato. P_{II}-UMP favorece la fosforilación de NR_I por NR_{II} (Keener y Kustu, 1988) y por consiguiente la activación de la transcripción desde el promotor *glnAp2*. En la **figura 5**, se muestran los componentes que intervienen en esta cascada regulatoria (revisado por Stock *et al.*, 1989).

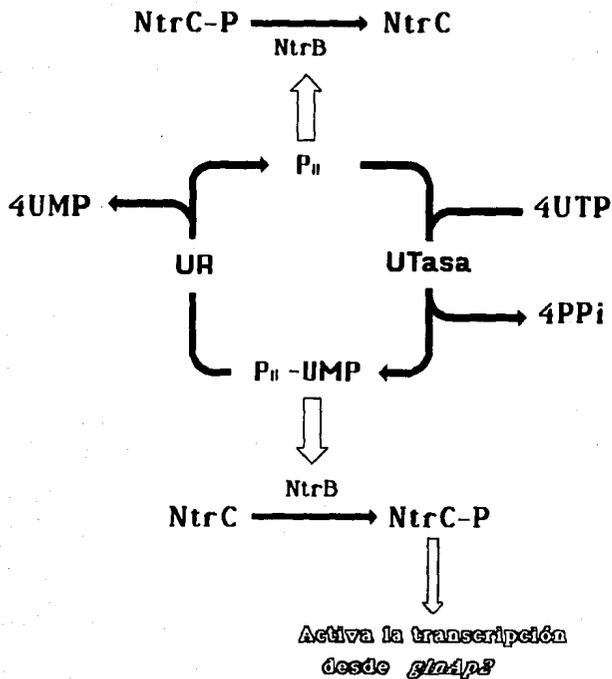


Figura 5. Papel de la proteína P_{II} en la regulación de la transcripción del gene *glnA*.

Recientemente se ha reportado que bajo condiciones de limitancia de nitrógeno, NR_I se adhiere a sitios localizados mas de 100-200 pares de bases hacia el extremo 5' desde el promotor (Reitzer y Magasanik, 1986; Popham *et al.*, 1989; Buck, *et al.*, 1986) que tienen las propiedades de mejoradores ("enhancers") de la transcripción del gen *glnA* por medio de la interacción física entre NtrC y la RNA polimerasa formando un "loop" [figura 6 (Su, *et al.*, 1990)].

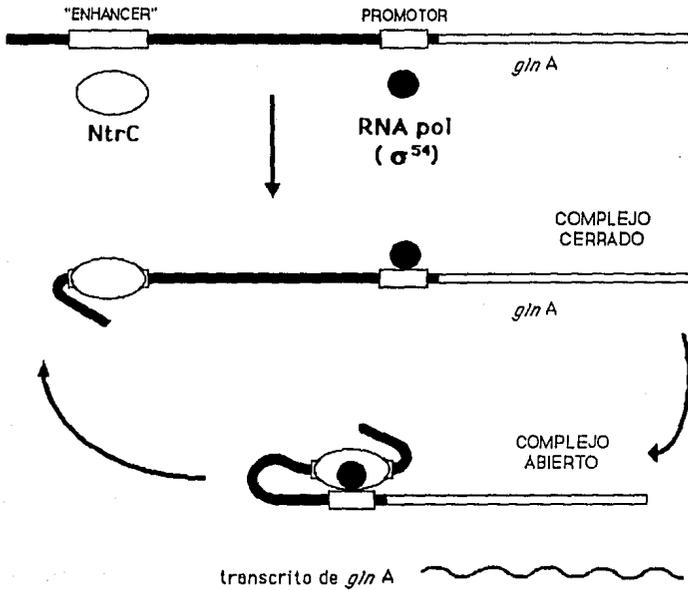


Figura 6. Modelo propuesto por Keener y Kustu (1990) para la activación de la transcripción mediada por NtrC (NR₁) de genes regulados por el sistema Ntr. Las proteínas NtrC y σ^{54} -RNAPol se unen a secuencias regulatorias específicas en el DNA para la activación de la transcripción.

2. ASIMILACION DE AMONIO EN *Rhizobium* .

Las bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, se caracterizan por establecer asociaciones simbióticas con plantas superiores, casi siempre leguminosas. El proceso simbiótico comienza cuando la bacteria infecta los pelos radiculares de las plantas y concluye con la formación de una estructura especializada, el nódulo. Dentro de este nuevo órgano, la bacteria se diferencia a bacteroide el cual es capaz de reducir nitrógeno molecular a amonio. El nitrógeno fijado de esta manera es exportado a la planta con intercambio de compuestos carbonados reducidos que son generados por fotosíntesis.

Los trabajos de Brown y Dilworth, (1975) han sugerido que en *Rhizobia* de vida libre, el amonio es asimilado tanto por la GDH como por la vía GS-GOGAT. Sin embargo también se ha sugerido que la actividad de GDH encontrada en *Rhizobia* tiene un papel estrictamente catabólico (Ludwig, 1980) y que el amonio se asimila por la vía GS-GOGAT para producir la glutamina y el glutamato necesarios (Ludwig, 1980; Bravo y Mora, 1989).

Recientemente, Lewis *et al.* (1990) han aislado cepas de *R. meliloti* con mutaciones en los genes que codifican para la GOGAT y sus resultados apoyan la idea de que la GDH no tiene un papel significativo en la asimilación de amonio en *Rhizobia*-ceae (Ludwig, 1980). Esta misma vía de asimilación de nitrógeno parece funcionar en plantas (Mifflin y Cullimore, 1984;

Robertson *et al.*, 1975).

En *Rhizobia* de vida libre se ha descrito la presencia de dos isoenzimas de GS's, GSI y GSII (Darrow y Knotts, 1977; Fuchs y Keister, 1980) que difieren en peso molecular de subunidad, estado oligomérico, termoestabilidad y forma de regulación. Esto ha complicado el estudio de la participación de cada una de las isoenzimas en la asimilación de amonio en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Hasta ahora se desconoce el papel que cada una de las dos enzimas tiene en el metabolismo intermediario del nitrógeno.

Aunque en *Rhizobiaceae* se han encontrado genes regulatorios y estructurales del metabolismo nitrogenado homólogos a los encontrados en enterobacterias, parece ser que su organización difiere en ambos grupos de bacterias.

GSI está codificada por el gen *glnA* y es muy similar a la GS de enterobacterias. Es una enzima polimérica formada por 12 subunidades idénticas de 55-59 kDa de peso molecular y es termoestable durante 1 h a 55°C. Presenta regulación por el sistema de modificación post-traducciona l de adenilación reversible y aparentemente no se regula de manera importante a nivel de transcripción (Adams y Chelm, 1988; Carlson *et al.*, 1987; Darrow y Knotts, 1977; Ludwig, 1980). El gen *glnA*, ha sido clonado de *R. meliloti* (Somerville y Kahn, 1983), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (*R.l.viceae*) (Colonna-Romano *et al.*, 1987), *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Espín *et al.*, 1988), y *B. japonicum* (Carlson *et al.*, 1985). La secuencia de

nucleótidos del gen *glnA* de *R.l.viceae*, predice una secuencia de aminoácidos con alta homología a la GS presente en *E. coli* y *A. brasilense*. En *B. japonicum* y *R. meliloti*, la expresión de *glnA* no depende del sistema de regulación nitrogenado. Mutaciones en *ntrA* o en *ntrC*, no afectan los niveles de actividad de GSI de manera significativa. Por otro lado, la secuencia de nucleótidos de *glnA* de *B. japonicum* y *R. meliloti* carece de la secuencia consenso de promotores regulados por el sistema Ntr.

En cuanto a la organización genética del gen *glnA*, se ha descrito que en Rhizobiaceae y en otras bacterias del suelo como *A. brasilense*, y a diferencia de lo que sucede en enterobacterias, el gen *glnA* y *glnB* forman parte del mismo operón, como se muestra en la **figura 7** (Martin *et al.*, 1989; Colonna-Romano *et al.*, 1987; de Zamaroczy *et al.*, 1990; Chiurazzi y Iaccarino, 1990; Moreno *et al.* 1991a, en prensa). En *B. japonicum* (Martin *et al.*, 1989) se expresa a partir de promotores dispuestos en tandem y se regulan de manera diferencial en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio. El promotor *glnBp2* es activado por el producto del gen *ntrC* tanto en vida libre como en simbiosis. El operón *glnBA* en *Azospirillum brasilense* presenta tres promotores, dos de ellos situados al extremo 5' del gen *glnB* y el otro entre *glnB* y *glnA*. Bajo condiciones de limitancia de amonio, se produce un transcrito bicistrónico expresado desde uno de los promotores de *glnB*, pero en condiciones de exceso de nitrógeno solo se produce el

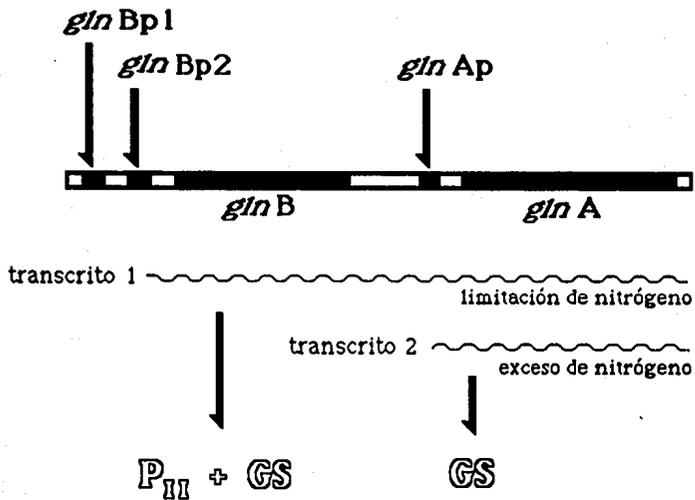


Figura 7. Organización de los genes *glnB-glnA* en algunas bacterias del suelo como *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

transcrito desde el promotor *glnA* (de Zamaroczy, *et al.*, 1990). También se han encontrado diferencias en la organización de los genes regulatorios *ntrB* y en *ntrC*. En enterobacterias, como ya se mencionó, los genes *glnA*, *ntrB* y *ntrC* forman parte del mismo operón, pero en *R.I.phaseoli*, estos dos últimos están formando parte de la misma unidad de transcripción no relacionada con *glnA* (Moreno *et al.* 1991, en prensa). Los datos de secuencia indican que el último codon del gen *ntrB* se traslapa con el primer codon de codificación de *ntrC*.

La GSII, producto del gen *glnII*, se ha reportado que tiene 8 subunidades idénticas con un peso molecular de 36-38 kDa, es termolabil y no parece ser regulada por el sistema de modificación post-traduccional como sucede con GSI. El gen *glnII* ha sido identificado en *B. japonicum* (Carlson y Chelm, 1986), *A. tumefaciens* (Rossbach, *et al.*, 1988), *R. meliloti* (de Bruijn, *et al.*, 1989; Somerville *et al.*, 1989) y *R.I.phaseoli* (Espín *et al.* 1989), y el análisis de secuencia del gen ha revelado una alta homología (ca. 80%) a las GS's de plantas y animales (Shatters y Kahn, 1989).

En cuanto a la regulación de la expresión (a nivel de síntesis de esta enzima), se ha mostrado que en *R. meliloti* (Shatters *et al.*, 1989) y *R.I. phaseoli* (Moreno *et al.*, 1991a) y, en *B. japonicum* (Martin *et al.*, 1988), se requiere del gen *ntrA* y el gen *ntrC* para la expresión del gen *glnII* y se ha encontrado una secuencia consenso de los promotores regulados por el sistema Ntr así como una región de DNA con alta afinidad para la

proteína NtrC en dirección 5' desde el promotor de tal manera que no es sorprendente encontrar que la GSII es regulada en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

Hasta ahora, no hay evidencia de que haya un sistema de regulación postraducciona para la GSII. Rao *et al.* (1978) han observado que en *B. japonicum*, la actividad de GSII es modulada por la tensión de oxígeno en el medio, de tal manera que bajo condiciones de microaerofilia la actividad de GSII es reprimida. Sin embargo, no se ha propuesto ningún modelo para explicar este hecho.

El análisis de mutantes en los genes estructurales de GSI o GSII de Rhizobiaceae ha sido difícil de evaluar. Se ha encontrado que una doble mutante *glnA glnII* de *B. japonicum* además de ser auxótrofa para glutamina, es Nod⁻ en soya cuando se usa un medio vegetal libre de nitrógeno pero Nod⁺ Fix⁻ si el medio de crecimiento de la planta es suplementado con glutamina (Carlson *et al.*, 1987). En contraste, en *R. meliloti* y *A. tumefaciens* ha mostrado que ninguna de las dos GS's es esencial para la interacción con plantas. En *R. meliloti* se ha mostrado que una doble mutante *glnA glnII* es silvestre en cuanto al fenotipo simbiótico (de Bruijn *et al.*, 1989; Rossbach, *et al.*, 1988) pero en *R.l.phaseoli*, una mutación por inserción en *glnA* es Nod⁺ pero la capacidad para reducir acetileno está disminuida en un 40% (Moreno *et al.*, 1991b). En bacteroides inducidos por *R.l.phaseoli* tipo silvestre, se ha encontrado tanto la actividad de transfera-

sa como el antígeno de GSI pero no en cepas *glnA* (Moreno *et al.*, 1991b). No se conoce el papel que esta enzima podría jugar en la asimilación de amonio en bacteroides aunque los datos sugieren que la producción de glutamina es necesaria para una actividad óptima de la nitrogenasa.

La existencia de dos genes GS's no está limitada a las Rhizobiaceae, sino que también se han identificado y clonado en algunas especies del actinomiceto *Frankia* (Edmands *et al.* 1987; Rochefort y Benson, 1990), el cual es capaz de fijar nitrógeno y formar asociaciones simbióticas con algunas plantas vasculares, y también se han descrito dos GS's en la mayoría de las especies de *Streptomyces* (Kumada *et al.*, 1990), las cuales, no se sabe que interaccionen con plantas superiores. En *Streptomyces viridochromogenes*, se ha identificado un gen con alta homología a *glnII* de *B. japonicum* y su producto proteico es una GS con características similares a la GSII de Rhizobiaceae (Behrmann *et al.*, 1990).

Es evidente a partir de estos resultados, que genes que codifican para dos GS's, están más diseminados de lo que anteriormente se pensó entre los microorganismos del suelo. Por lo tanto, la presencia de dos GS's debe ser considerado como un problema relevante para la fisiología bacteriana. Es interesante saber el efecto de dobles mutaciones sobre el metabolismo nitrogenado en estas especies.

3. EVIDENCIA GENETICA Y BIOQUIMICA DE QUE EXISTE UNA TERCERA GS EN *Rhizobium*.

Existe controversia en cuanto al número de GS's presentes en Rizobiaceas ya que algunos reportes sugieren la presencia de una tercera isoforma. En bacteroides de *R. lupini* (Evstigneeva *et al.*, 1983) se han podido detectar tres formas de GS y, en *R. meliloti*, *R.l.viceae* y en *R.l.phaseoli* Kumar y Rao (1986) han reportado la separación cromatográfica de tres formas de GS.

En *R. meliloti* (de Bruijn *et al.*, 1983) y en *A. tumefaciens* (Rossbach *et al.*, 1988) se ha identificado y aislado una secuencia de DNA denominada *glnT*, diferente de *glnA* y *glnII* capaz de complementar la auxotrofia para glutamina de mutantes *glnA* de *E. coli*. Sin embargo, en estas cepas complementadas no se logró detectar actividad enzimática de GS por los ensayos de transferasa ni biosintética (Rossbach, *et al.*, 1988; de Bruijn *et al.*, 1989) que permitieran conocer la identidad de la proteína codificada.

Recientemente, se ha reportado que una doble mutante de *R. meliloti* no es un auxótrofo estricto para glutamina, ya que cepas de este genotipo pudieron crecer en medios que contenían glutamato y amonio, pero no en medios que contenían aisladamente glutamato o amonio, como fuente de nitrógeno (Somerville *et al.* 1989). Esta observación, puede considerarse como una evidencia adicional de una vía alternativa para la síntesis de glutamina en cepas de *R. meliloti* carentes de

actividad de GSI y GSII.

Usando como probador la secuencia *glnT* de *R. meliloti* clonada en pFB6162, Espín *et al.* (1990) identificaron y aislaron un fragmento *Bam*HI del genoma de *R.l.phaseoli* con homología a *glnT*. Este fragmento de 12 kb, fue clonado en el plásmido pSUP202 (Simon *et al.*, 1983) para dar origen al plásmido pMW5a. Esta secuencia a semejanza de lo reportado para *R. meliloti* y *A. tumefaciens*, suprimió el requerimiento para glutamina de la cepa de *K. pneumoniae* 1811 (con una mutación en el gen *glnA*) (Espín *et al.*, 1982) cuando fue clonado en una dirección pero no cuando fue clonada en la dirección opuesta. Este resultado sugiere que la secuencia *glnT* podría transcribirse a partir de un promotor del vector y no a partir de su propio promotor (ver artículo adjunto) además de establecer el hecho de la posible presencia de una tercera GS en *R.l.phaseoli*.

A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*

G. Espin¹, S. Moreno¹, M. Wild¹, R. Meza¹, and M. Iaccarino²

¹ Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 2-246, Cuernavaca, México

² CNR, Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica, Via G. Marconi 10, I-80125 Napoli, Italy

Received January 31, 1990 / June 6, 1990

Summary. Using *glnT* DNA of *Rhizobium meliloti* as a hybridization probe we identified a *R. leguminosarum* biovar phaseoli (*R. l. phaseoli*) locus (*glnT*) expressing a glutamine synthetase activity in *Klebsiella pneumoniae*. A 2.2 kb DNA fragment from *R. l. phaseoli* was cloned to give plasmid pMW5a, which shows interspecific complementation of a *K. pneumoniae* *glnA* mutant. The cloned sequence did not show cross-hybridization to *glnA* or *glnII*, the genes coding for two glutamine synthetase isozymes of *Rhizobium* spp. While in previous reports on *glnT* of *R. meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* no glutamine synthetase activity was detected, we do find activity with the *glnT* locus of *R. l. phaseoli*. The glutamine synthetase (GSIII) activity expressed in a *K. pneumoniae* *glnA* strain from pMW5a shows a ratio of biosynthetic to transferase activity 10³-fold higher than that observed for GSI or GSII. GSIII is similar in molecular weight and heat stability to GSI.

Key words: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* – Glutamine synthetases – Nitrogen metabolism – *glnT*

In bacteria belonging to the family *Rhizobiaceae* two isozymes of glutamine synthetase (E.C. 6.3.1.2.) have been detected: GSI, similar to the glutamine synthetase from enteric bacteria, and GSII, a heat labile enzyme found in the *Rhizobiaceae* (Darrow and Knotts 1977; Fuchs and Keister 1980) and in *Frankia* sp. (Edmands et al. 1987). Genes coding for GSI and GSII have been identified (Carlson et al. 1985; Carlson and Chelm 1986; Colonna-Romano et al. 1987; de Bruijn et al. 1989; Espin et al. 1985, 1988; Filser et al. 1986; Rossbach et al. 1988; Somerville and Kahn 1983). Three forms of glutamine synthetase have been detected in *R. lupini* bacteroids (Evistigneeve et al. 1983), and in *R. leguminosarum*

bv. *viciae*, *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (hereafter called *R. l. phaseoli*) (Kumar and Rao 1986). However, no genetic evidence for the presence of a sequence coding for a third glutamine synthetase was presented in these studies.

A locus, called *glnT*, which complements the glutamine auxotrophy of *Escherichia coli* *glnA* mutants was first identified in *R. meliloti* (de Bruijn et al. 1984) and, recently, in *Agrobacterium tumefaciens* (Rossbach et al. 1988). However, no glutamine synthetase activity could be demonstrated in cell extracts of the complemented strains (Rossbach et al. 1988; de Bruijn et al. 1989), leading to several possible interpretations of those results.

To identify a *glnT*-like locus in *R. l. phaseoli*, we hybridized DNA of plasmid pFB6162, carrying the *glnT* locus of *R. meliloti* (de Bruijn et al. 1984) to a *Bam*HI digest of DNA isolated from strain CE3 of *R. l. phaseoli* and found positive signals with fragments of 3.0, 5.3, and 12.0 kb. When cloned into the vector pSUP202 (Simon et al. 1983), to give plasmid pMW5a, the 12 kb fragment complemented the glutamine auxotrophy of strain UNF1811, a *K. pneumoniae* *glnA* mutant (Espin et al. 1982) in one orientation only (Espin et al. 1988). Plasmid pMW5a suppresses the glutamine auxotrophy of *K. pneumoniae* strains carrying different mutations, including two different point mutations, *glnA202* and *glnA208*, and a deletion of the *glnA* and *ntfBC* genes (Espin et al. 1982) and all these strains show glutamine synthetase activity. These results rule out the hypothesis that pMW5a causes reactivation of an inactive *K. pneumoniae* *glnA* gene product.

The 12 kb *Bam*HI insert of pMW5a, used as a probe, showed no hybridization with DNA of plasmids pSM245 carrying the structural gene for GSI from *R. l. phaseoli* (Espin et al. in preparation) or pBJ196A (containing the *glnII* gene of *Bradyrhizobium japonicum*; Carlson and Chelm 1986), but hybridization with a single 12 kb *Bam*HI fragment present in CE3 DNA. These results show that the *glnT* locus is different from the rhizobial *glnA* or *glnII* genes coding for GSI and GSII

Table 1. Glutamine synthetase specific activities of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains

Strain	Heat stable		Heat labile	
	B	T	B	T
UNF1811	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010
UNF1811 (pMW5a)	0.672	0.019	<0.010	<0.010
CE3	0.036	0.638	0.038	1.230
SM58	<0.010	<0.010	0.060	1.360
CFN2012	0.044	0.873	<0.010	<0.010

B, biosynthetic activity; T, transferase activity

Bacteria were grown for 12 h on *Rhizobium* (Noel et al. 1984) or *Klebsiella* (Dixon et al. 1977) minimal media using glutamate as a nitrogen source, and glutamine synthetase specific activity values were determined in total cells as described by Bender et al. (1977). The heat-labile activity was determined by measuring activity before and after heat treatment (1 h incubation at 50°C) and subtracting the heat-stable fraction from the total activity. Units of activity are μ moles of gamma-glutamyl-hydroxamate formed per min; specific activity is expressed as units/mg protein. Protein determinations were carried out by the method of Lowry (1951). *Klebsiella* strain UNF1811 grown in glutamine showed no activity. Wild-type *K. pneumoniae* (UNF122) gave specific activity values of 0.023 (biosynthetic) and 0.080 (transferase)

activities, respectively. Moreover, pMW5a does not hybridize to the 3.0 and 5.3 kb fragments that appear when pFB6162 is used as a probe in a hybridization to *R. l. phaseoli* CE3 DNA, showing that these are not reiterated genes.

We assayed glutamine synthetase activity in *K. pneumoniae* strain UNF1811 (pMW5a), in *R. l. phaseoli* wild-type strain CE3 and in *R. l. phaseoli* strains SM58, lacking GSI activity (Espín et al. in preparation) and CFN2012, lacking GSII activity (Morett et al. 1985). We found (Table 1) that plasmid pMW5a codes for a heat-stable glutamine synthetase activity with a very high biosynthetic to transferase ratio, which we call GSIII. Transferase activity values are reproducible and the ratio of biosynthetic to transferase activity did not change during partial purification and concentration of the enzyme. The *R. l. phaseoli* wild strain showed, as expected, a heat-stable and a heat-labile fraction while strain SM58 (*glnA*) showed only heat-labile activity, and only heat-stable activity was detected in strain CFN2012 (lacking GSII activity). We conclude that both GSI and GSII, when expressed in *R. l. phaseoli*, have a ratio of biosynthetic to transferase activities of about 0.05, similar to the ratios found for glutamine synthetases from different microorganisms (see, for example, references quoted by Orr and Haselkorn 1981). However, GSIII expressed in *K. pneumoniae* shows a ratio about 10^3 -fold higher.

We assayed heat-stable and heat-labile biosynthetic and transferase activities in *R. l. phaseoli* strain CE3 grown in glutamine, ammonium or glutamate, or in ammonium plus glutamate as nitrogen sources, and in bacteroids. We found no difference in the ratio of biosynthetic to transferase heat-stable activities in any of the conditions tested. Therefore the *glnT* locus might be cryptic in *R. l. phaseoli*, or the gene product giving GSIII

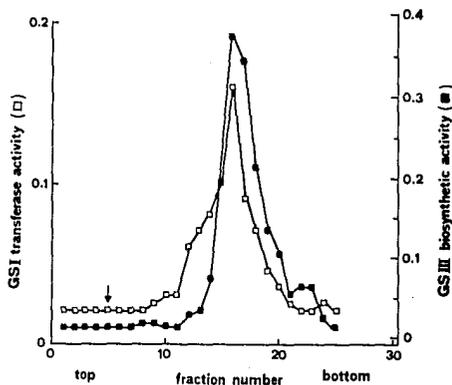


Fig. 1. Glutamine synthetase activity profiles from crude extracts (200 μ l) of: UNF1811 (pSM245) (□) with specific activity values of 0.670 for biosynthetic and 0.02 for transferase and UNF1811 (pMW5a) (●) with specific activity values of 0.013 for biosynthetic and 0.290 for transferase, run on 5%–20% sucrose gradients. Activities are given as A_{540} values. The arrow indicates the fraction with highest heat-labile activity obtained in a tube run in parallel, on which a crude extract of strain CE3 was loaded

activity in *K. pneumoniae* might be different in *R. l. phaseoli*.

We also compared the apparent molecular weight of GSIII with that of GSI and GSII. Crude extracts of strain UNF1811 (pMW5a) possessing only GSIII activity and of strain UNF1811 (pSM245), which has only GSI activity, were mixed in equal amounts and loaded on a sucrose gradient. After centrifugation and fractionation, biosynthetic (mainly GSIII) and transferase (mainly GSI) activities were determined for each fraction. As shown in Fig. 1, GSI and GSIII give a single peak, and the same result was obtained when the two extracts were run in different tubes. In a tube run in parallel, a crude extract of *R. l. phaseoli* CE3 grown on glutamate was fractionated and transferase activity was analysed before and after heat treatment (data not shown in the figure). The peak of the heat-stable activity (namely GSI), coincided with that shown in Fig. 1, while the most active fraction of the peak showing heat-labile activity, namely GSII, is fraction 5, indicated with an arrow in Fig. 1. This experiment shows that GSIII is similar in size to GSI and quite different from GSII.

We tried to construct derivatives of the *R. l. phaseoli* strains CE3, SM58 and CFN2012 carrying plasmid pMW5a to test for the presence of GSIII activity. As pMW5a cannot replicate in *Rhizobium* spp. we transferred it by conjugation after coinfection with either plasmid pB3 or R68.45 (Brewin et al. 1980). Transconjugants with all *R. l. phaseoli* stains appeared as very small colonies on minimal medium plates supplemented with the appropriate antibiotics, but failed to grow when restreaked on minimal or rich medium plates. As a control we transferred pMW5b, containing the insert of

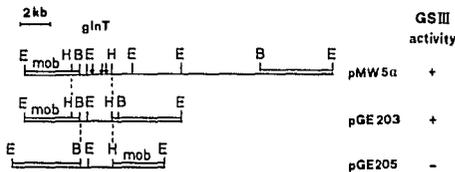


Fig. 2. Physical map of pMW5a and derivative plasmids pGE203 and pGE205. Restriction endonuclease cleavage sites for *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) and *Hind*III (H) are indicated. Open bars indicate pSUP202 vector sequences. The 2.5 kb *Hind*III fragment of pMW5a that includes a 0.3 kb *Hind*III-*Bam*HI fragment from the vector was cloned into the unique *Hind*III site of pSUP202 to give plasmid pGE203. The 2.2 kb *Bam*HI-*Hind*III fragment from pMW5a was ligated to pSUP202 digested with *Bam*HI-*Hind*III to give plasmid pGE205. Arrows indicate sites of Tn5 insertion in pMW5a, which abolish the ability to complement a *glnA* *Klebsiella pneumoniae* strain

pMW5a in the opposite orientation, into strain CE3 in the same way and obtained stable exconjugants. We also found that in the absence of selection, pMW5a is lost at a higher rate than the vector from *E. coli* and *K. pneumoniae* wild-type strains. Since pMW5b does not express GSIII, these results indicate that expression from a vector promoter of the gene(s) coded by the insert causes inhibition of growth. We think that the apparent toxicity caused by GSIII expression might be due to its very high biosynthetic activity, which could cause a depletion of either the glutamate or the ATP pools. In fact, a partial growth inhibition due to excess glutamine synthetase activity has been reported in *Salmonella typhimurium* mutants (Kustu et al. 1984).

In *R. meliloti* the *glnT* locus has been shown to form part of an operon encompassing about 5 kb of DNA and coding for five polypeptides (de Bruijn et al. 1989). To localize the *glnT* complementing sequence within the 12 kb *Bam*HI fragment we isolated thirty Tn5 derivatives of pMW5a and introduced them into *K. pneumoniae* UNF1811. Three out of thirty UNF1811 (pMW5a::Tn5) derivatives failed to grow in the absence of glutamine and were shown to carry the transposon inserted within a 3 kb *Eco*RI fragment (see Fig. 2). A 2.5 kb *Hind*III fragment containing 2.2 kb of *R. l. phaseoli* DNA and 0.3 kb of vector DNA (see legend to Fig. 2) was cloned into vector pSUP202 giving pGE203 and then the *R. l. phaseoli* DNA was recloned in the opposite orientation giving pGE205. These two plasmids were transformed into UNF1811 and the strains obtained were screened for their ability to grow in the absence of glutamine. Plasmid pGE203, but not pGE205, gave complementation and caused the appearance of GSIII activity. These results are summarized in Fig. 2 and allow us to delimit the *glnT* locus to a *Bam*HI-*Hind*III fragment of 2.2 kb and to confirm expression of GSIII from a promoter of the vector. We think that in the *R. meliloti* *glnT* locus itself one or two polypeptides are sufficient for glutamine biosynthesis, that their structural genes are located at the end of the operon and that the other Tn5 insertions described by de Bruijn

et al. (1989) show polar effects the GSIII structural gene(s).

In previous studies (de Bruijn et al. 1989; Rossbach et al. 1988; Carlson et al. 1987) it was shown that mutants of other *Rhizobiaceae* lacking both GS I and GS II are glutamine auxotrophs and it was thus concluded that other genes coding for glutamine synthetase activity are not present in these species. More recently (Somerville et al. 1989) it was claimed that a third glutamine synthetase may be present in *R. meliloti*. Our data are compatible with the hypothesis that the *glnT* locus codes either for a *R. l. phaseoli* glutamine synthetase or for an activator of a cryptic gene of *K. pneumoniae*. Likewise, the latter hypothesis cannot be ruled out by data published on the *glnT* locus of *R. meliloti* (de Bruijn et al. 1984, 1989) or *Agrobacterium tumefaciens* (Rossbach et al. 1988).

While we find glutamine synthetase activity in crude extracts of different *K. pneumoniae* strains carrying pMW5a, no activity was found in crude extracts of various *Escherichia coli* strains carrying the *glnT* locus of *R. meliloti* (de Bruijn et al. 1989). Alternative pathways for glutamine biosynthesis have not been described and the *glnT* genes of *R. meliloti* and *R. l. phaseoli* show a strong cross-hybridization. We therefore believe that the failure to detect glutamine synthetase activity after complementation with the *R. meliloti* *glnT* locus may have a trivial explanation, such as a requirement for a specific reaction mixture or inactivation during the preparation of crude extracts, and is perhaps associated with extra genes not present in pMW5a compared to pFB6162.

The finding of complementation with pMW5a, but not with pMW5b indicates that the GSIII structural gene is transcribed from a promoter of the vector and therefore we cannot exclude the possibility that the protein we detect is a hybrid protein synthesized from DNA of the vector fused to *R. l. phaseoli* DNA. If this hypothesis is correct the ratio of biosynthetic to transferase activity may be different in the protein synthesized under physiological conditions in *R. l. phaseoli*. A third glutamine synthetase form has been purified from *R. l. phaseoli* (Kumar and Rao 1986). This enzyme has a ratio of biosynthetic to transferase activities very different from that reported in this paper for GSIII.

Acknowledgements. This study was partially supported by grant Tecnologice avanzate in agricoltura from MAF, DPGA and by EEC collaborative grant C11-0408-1/C11-0410-ME. The work of G.E. in Italy was supported by EEC Fellowship C11-0242-1(SP). We thank M. Chiruzzi for help in some subcloning experiments, F. de Bruijn for pFB6162, B. Chelm for pBJ196A, M. Merrick for strain UNF1529 and G. Blasi for preparing the manuscript.

References

- Bender RA, Jansen KA, Resnick AD, Blumenberg M, Foor F, Magasanik B (1977) Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 129:1001-1009
- Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWW (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120:423-420

- de Bruijn FJ, Sundaresan V, Szeto WW, Ow DW, Ausubel FM (1984) Regulation of the nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti*: Role of nitrogen regulation (*ntr*) genes. In: Veeger C, Newton WE (eds) Advances in Nitrogen Fixation Research. Nijhoff/Junk, The Hague, pp 627-633
- de Bruijn FJ, Rossbach S, Schneider M, Radet P, Messmer S, Szeto WW, Ausubel FM, Schell J (1989) *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 171:1673-1682
- Carlson TA, Chelm BK (1986) Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature* 322:568-570
- Carlson TA, Guerinot ML, Chelm BK (1985) Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 162:698-703
- Carlson TA, Martin GB, Chelm BK (1987) Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 169:5861-5866
- Colonna-Romano S, Riccio A, Guida M, Defez R, Lamberti A, Iaccarino M, Arnold W, Priefer U, Pühler A (1987) Tight linkage of *glnA* and a putative regulatory gene in *R. leguminosarum*. *Nucleic Acids Res* 15:1951-1963
- Darrow RA, Knotts RR (1977) Two forms of glutamine synthetase in free-living root nodule bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 78:554-559
- Dixon R, Kennedy C, Kondorosi A, Krishnapillai V, Merrick M (1977) Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. *Mol Gen Genet* 157:189-198
- Edmunds J, Noridge NA, Benson DR (1987) The actinorrhizal root-nodule symbiont *Frankia* sp. strain CplI has two glutamine synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6126-6130
- Espin G, Alvarez-Morales A, Cannon F, Dixon R, Merrick M (1982) Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies on their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol Gen Genet* 186:518-524
- Espin G, Moreno S, Wild M (1985) Cloning of genes involved in glutamine synthesis in *Rhizobium phaseoli*. In: Evans HJ, Bottomley PJ, Newton WE (eds) Nitrogen fixation research progress. Martinus/Nijhoff, p 219
- Espin G, Moreno S, Wild M, Meza R (1988) *Rhizobium phaseoli* glutamine synthetases. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds) Nitrogen fixation: One hundred years after. Gustav Fischer, New York p 571
- Evistigneva ZG, Kaushl MV, Aseeva KB, Kretovich VL (1983) Multiple molecular forms of glutamine synthetase in *Rhizobium lupini* bacteroids. *Biokhimiya* 48:405-408
- Filser MMK, Moscatelli C, Lamberti A, Vincze E, Guida M, Salzano G, Iaccarino M (1986) Characterization and cloning of two *Rhizobium leguminosarum* genes coding for glutamine synthetase activities. *J Gen Microbiol* 132:2561-2569
- Fuchs RL, Keister DL (1980) Comparative properties of glutamine synthetase I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J Bacteriol* 144:641-648
- Kumar PS, Rao SLN (1986) Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to *Rhizobia*. *Curr Microbiol* 14:113-116
- Kustu S, Hirschman D, Burtun D, Jelesco J, Meeks JC (1984) Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. *Mol Gen Genet* 197:309-317
- Lowry D, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Moret E, Moreno S, Espin G (1985) Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine mutants of *Rhizobium phaseoli*. *Mol Gen Genet* 200:229-234
- Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, Leemans J, Cevallos MA (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158:148-155
- Orr J, Haselkorn R (1981) Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J Biol Chem* 256:13099-13104
- Rossbach S, Schell J, de Bruijn FJ (1988) Cloning and analysis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 loci involved in glutamine biosynthesis: Neither the *glnA* (GSI) nor the *glnII* (GSI) gene plays a role in virulence. *Mol Gen Genet* 212:38-47
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791
- Somerville JE, Kahn ML (1983) Cloning of glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 156:167-176
- Somerville JE, Shatters RG, Kahn ML (1989) Isolation, characterization, and complementation of *Rhizobium meliloti* 104A14 mutants that lack glutamine synthetase II activity. *J Bacteriol* 171:5079-5086

Communicated by H. Hennecke

OBJETIVOS.

Es evidente que en *R.l.phaseoli* de vida libre, la GSI y la GSII juegan un papel fundamental en la asimilación de amonio. Debido a que se ha encontrado actividad y antígeno de GSI en bacteroide (Moreno *et al.*, 1991 en prensa) resulta, pues, interesante preguntarse cual podría ser el papel que esta enzima desempeña en la asimilación de amonio en el bacteroide.

Existen evidencias para la presencia de una tercera isoforma de GS. Los datos reportados en el artículo adjunto, especialmente la complementación de una mutante *gln* y la hibridización con *glnT* de *R. meliloti*, sugieren fuertemente que la secuencia *glnT* de *R.l.phaseoli* codifica para una GS distinta a GSI y a GSII pero no se puede descartar la posibilidad de que esta secuencia funcione como activadora de un gen de GS críptico en *K. pneumoniae*.

El objetivo de este trabajo fué determinar en forma clara si *glnT* codifica para una tercera forma de GS, GSIII, o si es una secuencia que promueve la activación de una GS críptica de *K. pneumoniae*, así como continuar con nuestros estudios genéticos y bioquímicos de la GSIII.

Con esta idea en mente, nos propusimos como primer paso purificar la proteína responsable de la actividad de GSIII expresada en *K.pneumoniae* UNF1811 para:

1. determinar la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína y compararla con aquella deducida de la

secuencia de nucleótidos de *glnT* clonada en *K. pneumoniae*. Este experimento nos permitió saber sin ambigüedades, que la secuencia *glnT* es el gen estructural que codifica para la glutamina sintetasa III de *R. l. phaseoli*.

2. determinar algunas propiedades bioquímicas y fisicoquímicas como: estructura oligomérica, peso de subunidad, punto isoelectrico, temperatura óptima de actividad y K_m para glutamato, hidroxilamina y ATP. Estos experimentos nos permitirían conocer la identidad de la proteína codificada por *glnT* y hacer comparaciones con las propiedades cinéticas de otras GS's

3. generar anticuerpos específicos contra la proteína pura para usarlos en estudios inmunológicos como:

a. determinar si hay reacción cruzada con la GSI y la GSII rizobiales. La respuesta a esta pregunta nos permitiría saber que relación existe entre las proteínas GS's de *R. l. phaseoli*

b. hacer una búsqueda de este antígeno en extractos crudos de diversas cepas de *R. l. phaseoli* crecidas en vida libre o en simbiosis por medio de experimentos de inmunodetección con la finalidad de saber bajo que condiciones se expresa este gen.

MATERIAL Y METODOS.

1. Cepas.

Las cepas y plásmidos usadas en este trabajo se enlistan en el cuadro 1 junto con su característica relevante.

CUADRO 1. CEPAS Y PLASMIDOS QUE SE USARON EN ESTE TRABAJO

CEPA O PLASMIDO	PROPIEDADES RELEVANTE	REFERENCIA O FUENTE
<i>Escherichia coli</i>		
MX614	tipo silvestre	Dr F. Bastarrachea
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
UNF1811	<i>glnA</i> 201	Espín <i>et al.</i> ,1981
UNF5022	tipo silvestre	Espín <i>et al.</i> ,1981
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phasecolli</i>.		
CE3	tipo silvestre	Noel <i>et al.</i> ,1984
CFN2012	<i>nrC</i> ::Tn5, derivada de CE3	Moreno <i>et al.</i> ,1991a
SM58	<i>glnA</i> ::Km, derivada de la CE3	Moreno <i>et al.</i> 1991b
Plásmidos		
pMW5	pSUP202 que contiene <i>glnT</i> en un fragmento <i>Bam</i> HI de 12 kb de CE3.	Espín <i>et al.</i> (1990)
pGE203	pSUP202 que contiene <i>glnT</i> en el fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de 2.4 kb de pMW5.	Espín <i>et al</i> (1990)
pSM245	pSUP205 que contiene <i>glnA</i> en dos fragmentos <i>Eco</i> R1 de CE3	Moreno <i>et al.</i> 1991b
pSUP202	Apr ^r Cm ^r Tcr	Simon <i>et al.</i> , 1983.

2. Reactivos.

Todos los reactivos usados en este trabajo fueron grado "analítico". Los antibióticos usados en los medios de cultivo fueron Cm 50 µg/ml, Tc 5 µg/ml, Ap100 µg/ml, Nal 20 µg/ml, Km 60 µg/ml, Spc y Str 100 µg/ml.

3. Resinas.

DEAE-Sephacel y Sephacryl S-300, fueron obtenidos de Sigma; Hidroxilapatita fue obtenida de Bio-Rad.

4. Medios de cultivo .

Mínimo. El medio mínimo usado para el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* fué el mismo al reportado por Dixon *et al.*, (1977). Se usó el medio mínimo para *R.l.phaseoli* reportado por Noel, *et al.*,(1984). En algunos experimentos de crecimientos de los microorganismos se usó glutamina, KNO₃ o NH₄Cl₂ como fuente de nitrógeno a una concentración de 1mg/ml.

Rico . El medio rico para enterobacterias fue LB y consistió de 0.5% de extracto de levadura, 1.0% de peptona de caseína y 0.15 M de NaCl. El medio rico para *Rhizobium* consistió de 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona de caseína y 7 mM de CaCl₂.

5. Crecimiento de los microorganismos.

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y de *Escherichia coli*

fueron crecidas a 37°C con agitación constante de 300rpm. Las cepas de *R.l.phaseoli* fueron crecidas a 30°C y 300 rpm de agitación constante. Para la purificación, los cultivos se hicieron en matraces Fernbach con 1 litro de medio mínimo.

6. Purificación de bacteroides.

Aproximadamente 10 gr de nódulos inducidos por las cepas CE3, CFN2012 y SM58 de *R.l.phaseoli* (tabla I) en frijol Negro Jamapa, se homogenizaron en un mortero en presencia de hielo seco y amortiguador Imidazol-Mn (Imidazol 10mM: Mn 1mM; pH 7.15). El homogenado se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se centrifugó una vez mas a 12,000 rpm por 10 minutos y la pastilla se resuspendió 5 ml de amortiguador Imidazol-Mn. Esta suspensión se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa con 2ml de sacarosa al 60%, 4ml al 40% y 5ml al 20%. Los bacteroides se colectaron de la interfase entre las soluciones al 40% y al 60% de sacarosa.

7. Ensayos enzimáticos para GS.

Los ensayos enzimáticos para GS fueron hechos de acuerdo al protocolo reportado por Bender *et al.* (1977). A 400 l de mezcla de reacción que contenía todos los sustratos excepto gln (en el ensayo de transferasa) y ATP (en el ensayo de sintetasa), se añadieron 50 µl de extracto crudo o enzima purificada y la reacción se inició adicionando 50 µl de glutamina 20 mM o 60

μ l de ATP 40mM, respectivamente. El pH de la mezcla de reacción de transferasa se ajustó a 7.55 y el de la mezcla de reacción de sintetasa se ajustó a 7.7. Bajo estas condiciones, 1 unidad de actividad enzimática, produce una absorbancia de 0.532 UDO a 540 nm de longitud de onda durante 1 minuto de reacción. La actividad específica se dió en μ M de γ -glutamil-hidroxamato por minuto por mg de proteína.

8. Purificación de la GSIII.

Ocho litros de medio mínimo fueron inoculados con 10 ml de un precultivo de *Klebsiella pneumoniae* UNF1811(pGE302) (Espín *et al.*, 1990) crecido durante 12 hs. Los cultivos se dejaron crecer hasta la fase exponencial, aproximadamente 8hs. Las células se cosecharon por centrifugación a 8,000 rpm a 4°C, la pastilla se lavó 3 veces con un amortiguador Imidazol-Mn (compuesto de 10 mM de Imidazol y 1 mM de MnCl₂, pH 7.15) y ésta finalmente se resuspendió en 400 ml del mismo amortiguador. Inmediatamente después de este paso se midió actividad biosintética.

Las células se rompieron en un sonicador a una frecuencia de 20 μ M de amplitud con pulsos de 1 minuto y descansos de 30 segundos durante un tiempo total de 5 min. El material se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 min, la pastilla se descartó y el sobrenadante se usó para la purificación. A este sobrenadante se le llamó **extracto crudo** .

Un esquema de la purificación de la GSIII se muestra en la **figura 8**. El extracto crudo se trató con calor durante una hora a 50°C, se centrifugó y la pastilla, que contenía material desnaturalizado, se descartó. El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% de saturación incubando a 4°C durante 20 minutos con agitación constante, se centrifugó y la pastilla se descartó. El sobrenadante, donde permaneció aproximadamente el 95% de la actividad de GS se llevó hasta un 65% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, incubando nuevamente durante 20 minutos y posteriormente se centrifugó. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en amortiguador Imidazol-Mn en una relación 1/20 del volumen original, y se dializó durante toda la noche contra el mismo amortiguador con cambios constantes. Paralelamente se registró el contenido de sal de la muestra midiendo conductividad. Una vez dializado, este material se cargó en una columna de DEAE-Sephacel de 1.5 cm de ancho por 30 cm de largo previamente equilibrada con 200 ml de amortiguador Imidazol-Mn. Las fracciones proteicas fueron eluidas con 100 ml de un gradiente lineal de 0-0.5 M de KCl en amortiguador Imidazol-Mn a una velocidad de 30ml/h y se colectaron en fracciones de 1.5 ml. La salida de material proteico se detectó con un monitor de luz UV y a cada fracción se le midió actividad de GS por medio del ensayo biosintético para localizar el pico donde eluyó la enzima. Las fracciones que contenían la actividad de GSIII se mezclaron, se concentraron por precipitación con sulfato de amonio y se cargaron a

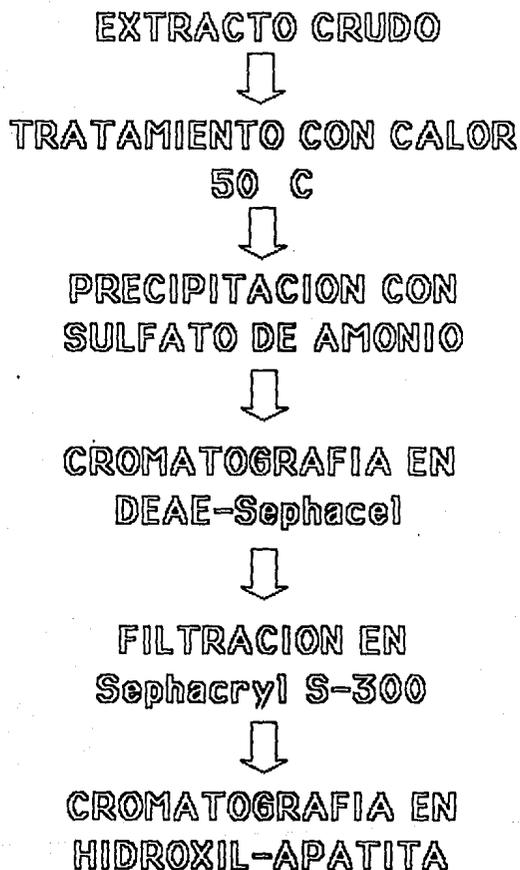


Figura 8. Esquema de purificación de la GSIII, a partir de pGE203 expresado en *Klebsiella pneumoniae*

una columna de Sephacryl S-300 de 1.5 cm por 50 previamente equilibrada con 1.5 litros de amortiguador Imidazol-Mn. Las fracciones se eluyeron por gravedad recogiendo fracciones de 3 ml. El pico proteico que contenia la actividad enzimática fue analizado por electroforesis desnaturalizante y cargado a una columna de hidroxilapatita de 1.0 cm por 10 cm tambien previamente equilibrada con amortiguador Imidazol-Mn que contenía 5 mM fosfatos de sodio. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de fosfatos de 5 mM a 250 mM en amortiguador Imidazol-Mn a una velocidad de 20 ml por hora. Las fracciones se colectaron en fracciones de 1.5ml y a cada una de éstas se le determinó actividad enzimática. La concentración de proteína de todas las muestras se determinó por el método de Lowry *et al.* (1957). De cada uno de los pasos de purificación se hizo una electroforesis para determinar el grado de pureza de la enzima. La enzima purificada de esta manera se destinó para la obtención de anticuerpos y para la determinación de las Km así como para la determinación de la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal.

9. Electroforesis.

a. Desnaturalizante . La electroforesis desnaturalizante se hizo de acuerdo a la técnica de Laemli (1970). En cada carril se cargaron 50 μ g de proteína total en extracto crudo o 5-10 μ g de enzima pura.

b. Nativa. Esta modalidad se usó para detectar las actividad enzimática de GS. El protocolo usado fué el mismo de Laemli (1970) pero se omitieron las condiciones desnaturizantes como el tratamiento de la muestra con 2-mercaptoetanol, el tratamiento con SDS y el tratamiento por ebullición.

c. Preparativa reversa. Esta técnica se usó para obtener la GSIII desnaturizada y usarla en los ensayos de inmunización. 5 mg de enzima pura fueron cargados a un gel preparativo tipo Laemli (1970). Después de la electroforesis, se separaron los costados del gel, se tiñeron con Comassie para localizar la migración de la banda de GSIII, se cortó y se practicó una electroforesis reversa. Esta consistió en incluir la banda de interés en un gel preparativo de acrilamida al 5%. La preparación del gel se hizo con amortiguador de corrida con el 10% de SDS. La electroforesis se realizó durante 18 hs de corrida con la polaridad invertida y la proteína se recuperó en el pozo. Posteriormente, se dializó contra amortiguador Imidazol-Mn para quitar exceso de sales. De la proteína recuperada se tomó una muestra y su pureza se determinó electroforéticamente.

d. Isoelectroenfoque en 2 dimensiones. El isoelectroenfoque de la GSIII se llevó a cabo de acuerdo a Dumbbar, 1990. La primera dimensión fué corrida en un rango de anfolinas de 3 a 10 y de 5 a 7. La segunda dimensión se llevó a cabo en un gel de acrilamida desnaturizante al 10%. Durante el isoelectroenfoque se usaron 8 g de proteína pura.

10. Inmunizaciones.

Tanto la proteína pura nativa como la obtenida por electroforesis reversa se usaron para la obtención de anticuerpos. Los animales de experimentación fueron conejos Nueva Zelanda machos de aproximadamente 3 meses de edad. Las inmunizaciones consistieron en la aplicación de 500 μ g de proteína incluida en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea. Cuatro y siete días después de la primera inmunización se les dió un refuerzo con 250 μ g de proteína bajo las mismas condiciones. Doce días después de la primera inmunización los conejos se sangraron para la obtención de anticuerpos.

11. Preparación de anticuerpos.

De cada uno de los dos conejos se obtuvieron 60 ml de suero y posteriormente se incubaron a 37°C durante 2 h para la formación del coágulo sanguíneo. El suero se separó y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos para retirar los eritrocitos remanentes. La fracción γ -globulina se precipitó tres veces con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% de saturación con agitación suave y constante durante 20 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. La pastilla se resuspendió con 1 volumen de PBS (amortiguador de fosfatos de sodio 0.5 M, pH 7.4 con NaCl 0.15 M). Este tratamiento se hizo tres veces. Finalmente, el precipitado que contenía los anticuerpos, se resuspendió en 1.5 ml de PBS y se dializó contra 20 volúmenes

de PBS a 4°C hasta que la conductividad de la solución de anticuerpos fuera la misma que la del PBS. Después de la diálisis, los anticuerpos se almacenaron a -20°C en alícuotas de 200 l hasta su uso. Todos los pasos se hicieron a 4°C. De esta manera se obtuvieron dos lotes de anticuerpos: uno dirigido contra la enzima pura nativa y el otro dirigido contra la enzima pura desnaturalizada. Estos anticuerpos fueron usados para llevar a cabo experimentos tipo Ouchterlony , tipo Western e inmunoprecipitaciones.

12. Experimentos tipo Ouchterlony.

Se prepararon extractos crudos de las diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae* crecidas en medio rico y *R.I.phaseoli* (tabla I) crecidas bajo diferentes fuentes de nitrógeno con el fin de detectar la presencia de antígeno de GSIII. En cada pozo de una placa de Ouchterlony se cargaron de 15 a 20 µg de proteína total y se dejaron en reposo a temperatura ambiente hasta observar la formación de líneas de precipitación. Para la titulación del anticuerpo, 15 µg de antígeno de GSIII pura se cargaron en el pozo central y el anticuerpo a diferentes diluciones se cargó en los pozos periféricos. Se probaron diluciones desde 1:2 hasta 1:64. Los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:8.

13. Experimentos tipo Western.

Los experimentos de inmunodetección se llevaron a cabo de

acuerdo Towbin *et al.* (1982) agregándose 0.1 gr de SDS al amortiguador de transferencia. 100 a 200 μ g de proteína total o 5-10 μ g de enzima pura, fueron cargados a geles de poli-acrilamida desnaturizantes al 10% de concentración (Laemli 1970). Después del corrimiento, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electrodifusión durante 2.5 hs y fueron revelados con el sistema de fosfatasa alcalina o GAR-peroxidasa.

14. Determinación de la temperatura óptima de actividad.

Para determinar la temperatura óptima de actividad, los ensayos de tranferasa de GSI y de sintetasa de GSIII se realizaron como se describió anteriormente (Bender *et al.*, 1977). Se usó un rango de temperatura de 20°C a 70°C. El tiempo de reacción fue de 5 min.

15. Determinación de las K_m para glutamato, hidroxilamina y ATP de la GSIII.

La determinación de los valores de K_m de la GSIII se hizo midiendo la actividad biosintética de la enzima pura al variar la concentración de uno de los substratos mientras se mantenía constante la concentración de los demás. La actividad enzimática se midió de acuerdo a Bender *et al.* (1977) a 30°C y se usaron 5 μ g de enzima pura durante un tiempo de reacción de

2 minutos.

16. Determinación de la secuencia N-terminal de la proteína.

Una muestra de 2 mg de la proteína purificada fue enviada al laboratorio del Dr. M. Iaccarino para la determinación de la extremo amino terminal. Esta se llevó a cabo por medio de la reacción degradativa de Edman en un secuenciador automatizado.

17. Análisis de la secuencia de DNA.

El fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 2.4 kb del inserto clonado en pMW5 fue subclonado para dar origen al plásmido pGE203 (ver figura 1 del artículo adjunto), y expresado en *Klebsiella pneumoniae* UNF1811.

El fragmento de DNA clonado en pGE203, que contiene el gen *glnT*, fue secuenciada por el método de terminación de la cadena (Sanger *et al.*, 1977) en el laboratorio del Dr. M. Iaccarino. La secuencia de nucleótidos fué comparada con las secuencias existentes en el GENBANK (Release 03/90). Los análisis de secuencia fueron hechos con una computadora VAX Server 3500 usando los programas FASTA (Lipman and Pearson, 1985) y Seqaid.

RESULTADOS

En la tabla 2 se exponen las actividades de GS's de las cepas usadas en los experimentos. En esta tabla podemos ver que la relación de actividad biosintética/transferasa para GSI, GSII y GSIII son distintas entre sí. Estas actividades nos permiten distinguir a cada una de las tres isoenzimas.

TABLA 2. Actividades de Glutamina sintetasa en las diversas cepas usadas en los experimentos.

CEPA	TE#		TL*		GSI	GSII	GSIII
	Tra	Bio	Tra	Bio	T/B	T/B	T/B
<i>K. pneumoniae</i>							
UNF1811	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-	-	-
UNF1811(pMW5a)	0.019	0.672	<0.01	<0.01	-	-	35
UNF1811(pSUP202)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-	-	-
<i>R.l.phaseoli</i>							
CE3	0.63	0.036	1.230	0.038	0.056	0.030	-
SM58	<0.01	<0.01	1.360	0.060	-	0.044	-
CFN2012	0.87	0.044	<0.010	0.010	0.050	-	-

#TE: Actividad termoestable durante 1h a 50°C; *TL: Actividad termolabil bajo las mismas condiciones; AE: actividad específica en μ moles de γ -glutamihidroxamato min^{-1} mg de prot⁻¹.

Los ensayos enzimáticos practicados a extractos de las cepas de *K.pneumoniae* y a cepas de *R.l.phaseoli* crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno y carbono (**Tabla 2**), indican que ninguna cepa de *R.l.phaseoli* mostró un nivel de actividad biosintética comparable a la actividad clonada en pMW5a.

1. PURIFICACION DE LA GSIII

La purificación de la GSIII fué posible debido a que este gen pudo ser expresado en *K. pneumoniae* UNF1811 complementando el fenotipo *gln-* y debido a que la actividad de su producto pudo ser detectado. Una de las características que distingue a la GSIII de *R.I.phaseoli* de la GSI y la GSII es su alta actividad biosintética y su baja (o no detectable) actividad de transferasa.

Después del tratamiento con calor a 50 C, se recuperó el 100% de la actividad y la enzima fué purificada aproximadamente 1.5 veces. Al ser precipitado con sulfato de amonio, este material se purificó 6 veces pero durante la diálisis se perdió el 35% de actividad. Esto se debió, probablemente, a la desnaturalización enzimática. La proteína resultante de este paso de purificación se aplicó a una columna de DEAE-Sephacel y las proteínas fueron eluidas con un gradiente de KCl. El perfil cromatográfico se detalla en la **figura 9**. La enzima eluyó entre 0.18 y 0.25 M de KCl.

El pico de actividad resultante de la cromatografía fué concentrado y aplicado a una columna de filtración Sephacryl S-300 en donde se puede ver que la actividad eluyó con el volumen vacío (**figura 10**). El pico que contenía la actividad enzimática fué concentrado y dializado antes de cargarse a una columna de Hidroxilapatita. La enzima fué eluida con 50 ml de un amortiguador de fosfatos.

El pico que contenía la actividad enzimática, fué analizado

CROMATOGRAFIA EN DEAE-Sephacel

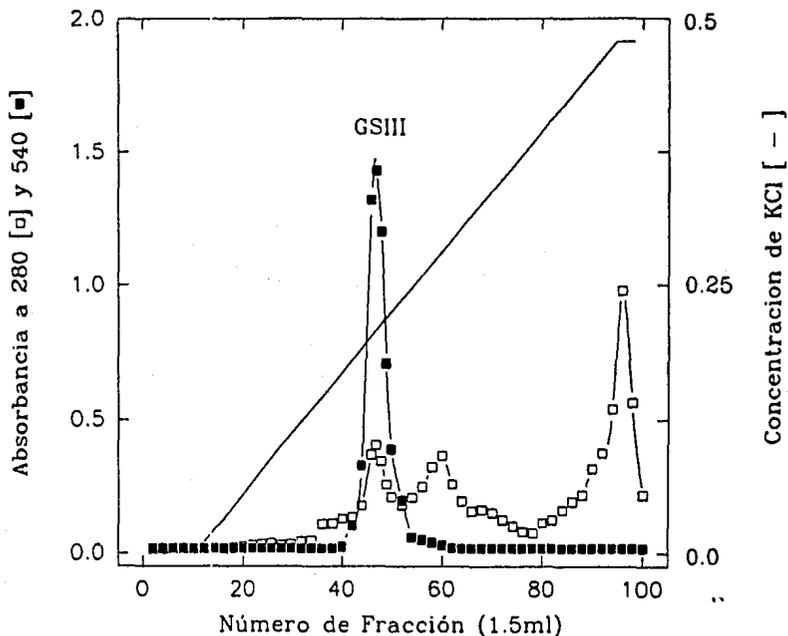


Figura 9. Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sephacel de un corte con sulfato de amonio del 45-60% a un extracto crudo tratado con calor. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente de KCl de 0-0.5 M.

[□]: detección de proteína por absorbancia a 280 nm; [■]: Actividad de GSIII por absorbancia a 540nm.

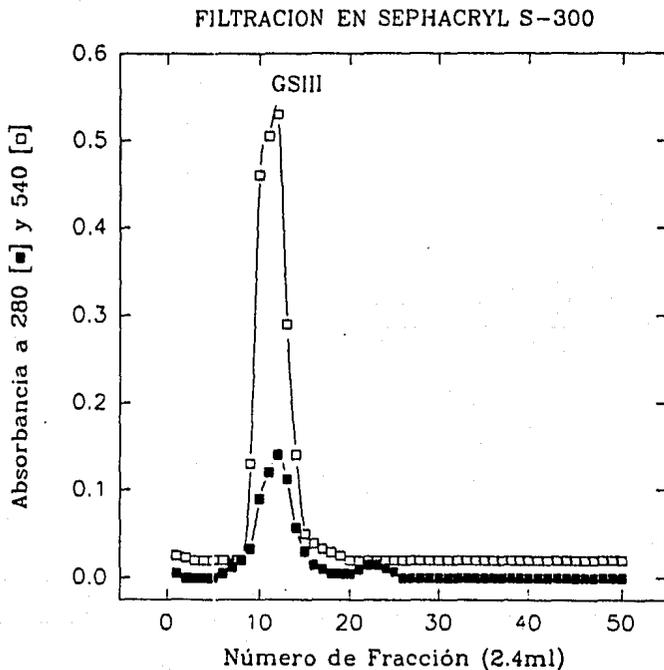


Figura 10. Perfil de elución en Sephacryl S-300 por proteína por absorbancia a 280 nm [■], y por actividad biosintética de GSIII [□] midiendo absorbancia a 540 nm.

electroforéticamente en geles de SDS al 10%. Simultaneamente se corrieron marcadores de peso molecular. Este experimento reveló una sola banda proteica con un peso molecular de 51 kDa aproximadamente. De esta manera obtuvimos una preparación enzimática con un 99% de pureza (**figura 11**). El perfil de purificación de la actividad enzimática se consigna en el **tabla 3**.

TABLA 3. Perfil de purificación de la glutamina sintetasa III de *R.l.phaseoli* expresada en *Klebsiella pneumoniae* UNF1811 (pGE203).

PASO DE PURIFICACION	* Act.Esp.	Unidades Totales	Rend.	Veces de Purif.
Extracto crudo	0.431	896	-	1.0
Tratamiento con	0.851	871	97	1.17
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (45-60)	1.058	425	47.4	2.45
DEAE-Sephacel	4.79	358	40	11.0
Sephacryl S-300	9.00	153	17	47.0
Hidroxilapatita	41.13	88	10	91.0

* Act.esp.= actividad específica en moles de γ -glutamil hidroxamato (minuto)⁻¹(mg de proteína)⁻¹

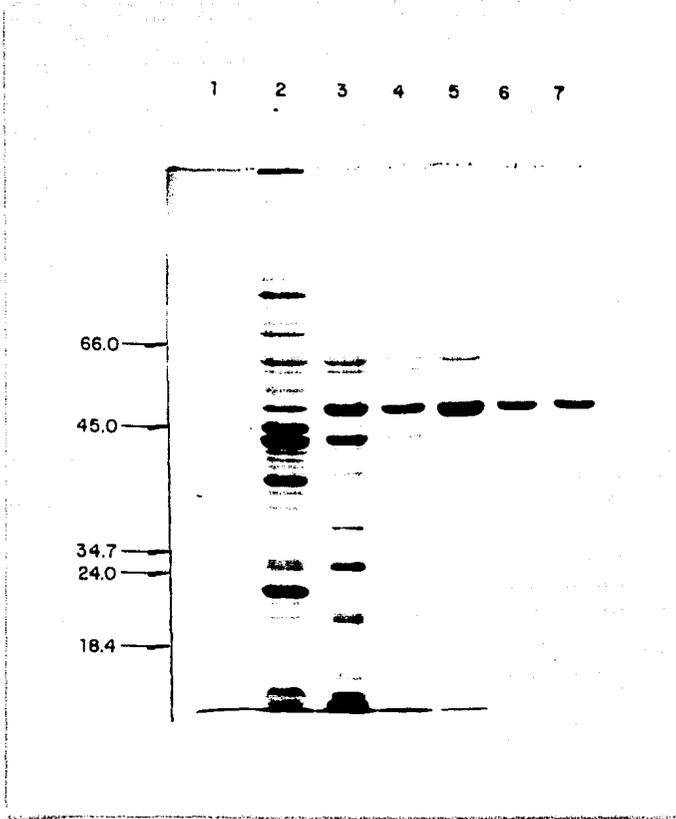


Figura 11. Electroforesis desnaturalizante tipo Laemli en geles de acrilamida al 10% de los diferentes pasos durante la purificación de GSIII. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: precipitación con sulfato de amonio; carril 4: pico de DEAE-Sephacel; carril 5: pico de Sephacryl S-300; carril 6 y 7: pico de la cromatografía en hidroxilapatita.

2. Determinación de la secuencia del extremo N-terminal.

La secuencia de los primeros 7 aminoácidos obtenida a partir de la proteína purificada concuerda perfectamente con aquella deducida de la secuencia de nucleótidos. La secuencia obtenida del extremo N-terminal por el método de degradación de Edman es: **M T L D L A A**

3. Caracterización de la enzima GSIII.

a. Temperatura de actividad óptima

La actividad de la GSIII fué medida a diferentes temperaturas desde 20°C hasta 70°C. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **figura 12**, en donde podemos ver que la enzima tuvo una máxima actividad a 60°C. La GSI de *R.l.phaseoli* mostró una temperatura óptima de 50°C, cuando el experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones.

b. Actividad en geles nativos

Una de las características de la mayoría de las glutamina sintetasas de bacterias es que su actividad puede ser detectada en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. También es posible, de esta manera, identificar las actividades de la GSI y la GSII de *R.l.phaseoli* en base a su velocidad de migración en su estado nativo y en base a su diferente sensibilidad al calor. Estas actividades enzimáticas son perfectamente separables cuando se aplican a un gel nativo en gradiente de

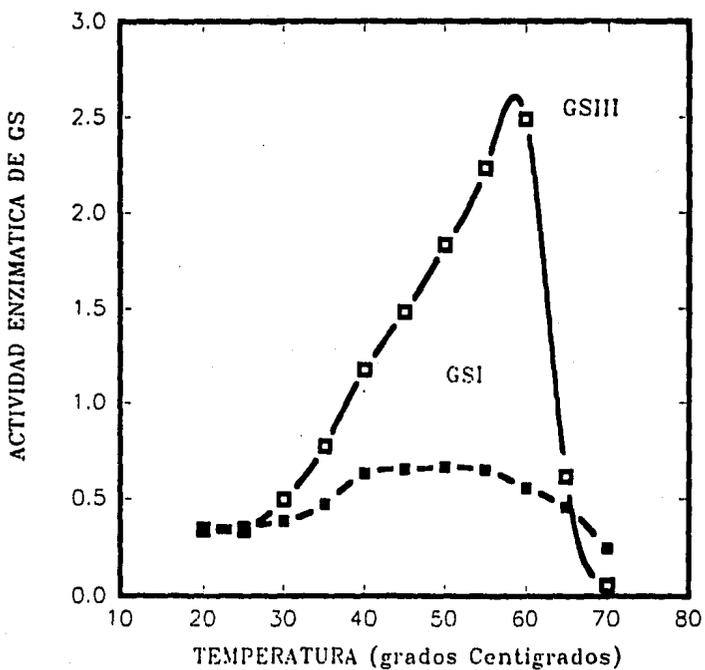


Figura 12. Curva de actividad de transferasa de la GS I y biosintética la GSIII a diferentes temperaturas. Los ensayos enzimáticos de transferasa y biosintéticas se realizaron como reportado en Material y Métodos.

concentración de acrilamida del 4-8%. Bajo estas condiciones se revelan por actividad dos bandas cuando el extracto proviene de la cepa CE3 crecida en glutamato como fuente de nitrógeno, pero la banda de actividad con mayor velocidad de corrimiento correspondiente GSII desaparece si este mismo extracto es calentado a 50°C durante una hora. De la misma manera, solo es detectable una banda de actividad si el extracto proviene de la cepa CE3 crecida en amonio o medio rico o cuando el extracto proviene de la cepa CFN2012; la cual es una mutante que carece de GSII. La característica de ser detectada en geles nativos no es compartida con la GSIII de *R.l.phaseoli*. La actividad de esta enzima no fué vista cuando muestras de extractos de *K.pneumoniae* UNF1811 (pMW5a), extractos de diferentes cepas de *R.l.phaseoli* crecido bajo diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, o enzima pura fueron aplicadas a geles no desnaturizantes y su presencia determinada por medio de la actividad biosintética (**figura 13**). Antes de cargar el gel, a la enzima pura se les determinó actividad de GS biosintética con el fin de asegurarnos que estuviese funcional.

c. Inmunodetección

Con el fin de detectar el antígeno de GSIII, se crecieron las cepas de *R.l.phaseoli* en las mismas condiciones antes mencionadas y se realizaron experimentos tipo Western y de inmunodifusión en agarosa tipo Ouchterlony. En los experimentos tipo Western se usaron los anticuerpos producidos

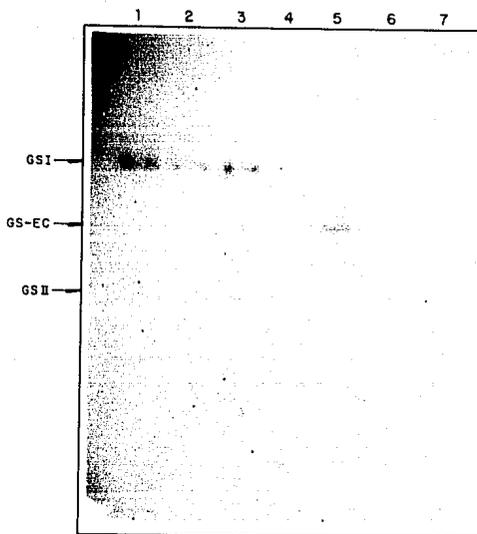


Figura 13. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración del 4-8% de extractos de *R.I. phaseoll* crecido en medio rico (carril 1), medio mínimo (MM)-amonio (carril 2), MM-glutamato (carril 3), pGE203 (carril4), *Escherichia coli* en MM (carril 5), *R.I. phaseoll* CFN2012 (GSII, carril 6), pSM245 (carril 7). El gel fue teñido por actividad biosintética.

contra la proteína desnaturalizada ya que los anticuerpos dirigidos contra la proteína nativa no cruzaron contra la enzima pura, el control positivo.

No se detectó ninguna banda proteica que fuere reconocida por anticuerpos anti-GSIII cuando se usaron extractos provenientes de diferentes cepas de *R.l.phaseoli*. Solo hubo reacción cruzada en los carriles donde fue cargado un extracto de *K.pneumoniae* UNF1811(pMW5a) o enzima pura (**figura 14**). Por otro lado, estos anticuerpos tampoco cruzaron contra un extracto de pFB6162, el cual lleva clonado el locus *glnT* de *R. meliloti*.

Los resultados de los experimentos de inmunodifusión dieron esencialmente los mismos resultados que aquellos obtenidos por Western. Para realizar los experimentos tipo Ouchterlony, se usaron los anticuerpos contra la proteína nativa y aquellos contra la proteína desnaturalizada. En este tipo de experimentos, sólo los anticuerpos dirigidos contra la proteína nativa fueron capaces de dar reacción cruzada con los extractos de *K. pneumoniae* UNF1811(pMW5a) o enzima pura. No se detectó reacción cruzada en extractos de las diferentes cepas de *R.l.phaseoli* (datos no mostrados).

d. Determinación del punto isoelectrico.

Se realizaron electroforesis en dos dimensiones tipo O'Farrell, primero enfocando la proteína a su pH isoelectrico y después por peso molecular. Los experimentos mostraron que la enzima pura tiene su punto isoelectrico a pH de 6.2 (**figura15**)

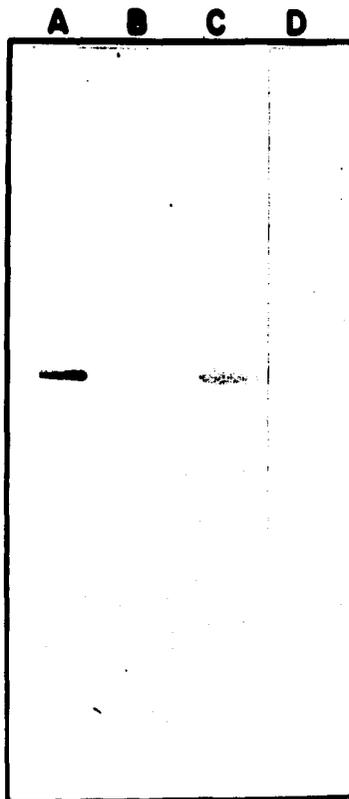


Figura 14. Experimento tipo Western de extractos crudos de: GSIII (carril A), *Klebsiella pneumoniae* 1811 (carril B), pGE203 (carril C), y pSUP202 (carril D). En este experimento se usaron anticuerpos contra la proteína desnaturizada y las bandas fueron reveladas con GAR-peroxidasa.

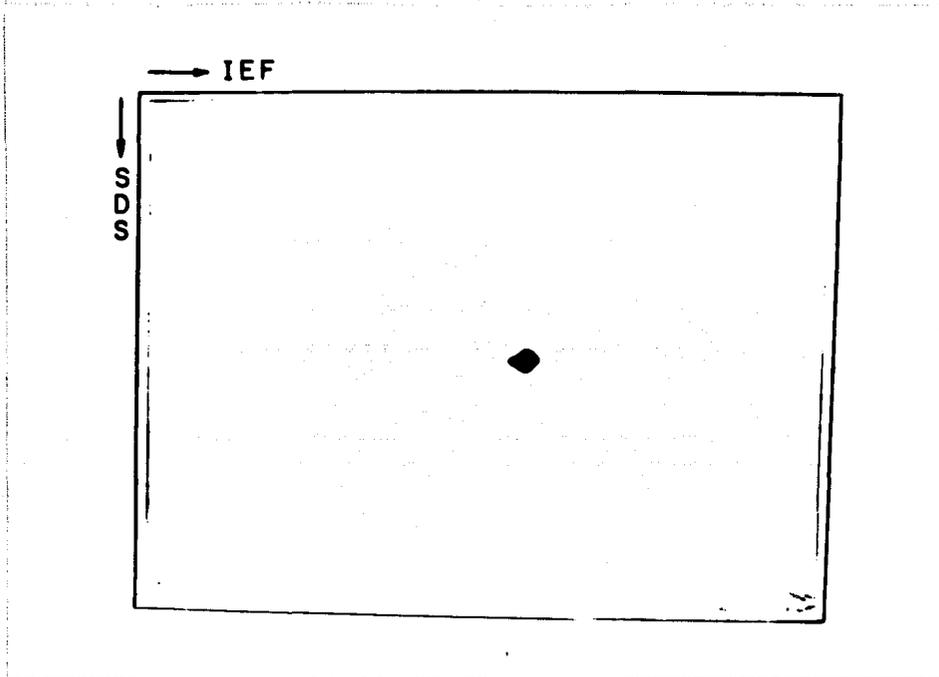


Figura 15. Electroforesis tipo O'Farrel de la GSIII pura. La proteína se enfocó durante 18 hs en anfolinas de 3-10 y de 5-7. La segunda dimensión fué hecha en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%.

y que está compuesta por monómeros idénticos de peso molecular de casi 51 kDa.

Determinación de los valores de K_m .

Se realizaron determinaciones de actividad biosintética de esta enzima con diferentes concentraciones de sustratos. Los valores de K_m muestran que esta enzima tiene una alta afinidad por ATP ($K_m = 0.087\text{mM}$) pero una afinidad baja para glutamato ($K_m = 16\text{mM}$). La K_m para hidroxilamina fué de 4.0mM . En las figuras **16a**, **16b** y **16c** se muestran los resultados obtenidos experimentalmente y en los recuadros se presentan las transformadas de Hanes () para cada una de ellos.

4. Analisis de secuencia de DNA.

El análisis de la secuencia de nucleótidos de *glnT*, indicó que inserto clonado en pGE203, contiene dos ORF's potenciales. El ORF1 está comprendido entre las bases 107-1414. El ORF2 está contenido entre las bases 1460 y 2383 y tiene una alta homología (47%) con el locus *tyr-T* de *E. coli* (Goodman *et al.*, 1968) y hasta un menor grado (38%) con los genes *purB-C* del operón de *B. subtilis* que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de purinas (datos no mostrados). La **figura 17** muestra la secuencia de nucleótidos del inserto junto con la secuencia deducida de aminoácidos codificada por el ORF1.

El ORF1 abarca una longitud de 1308 pb (desde la posición

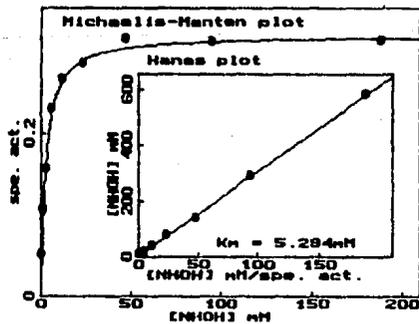
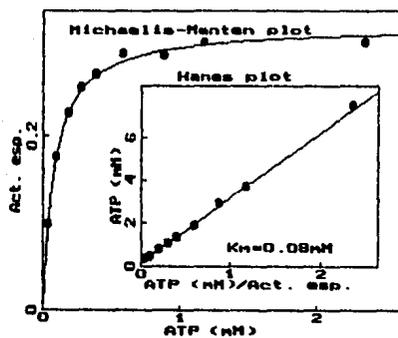
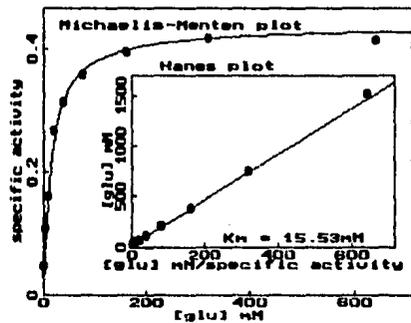


Figura 9. Curvas que muestran las K_m para A: glutamato; B: ATP; C: hidroxilamina. Para cada experimento se usaron 3 μ g de enzima pura.

	GGATCCCCGGCAAGG	16
AGGCTTTTGATTTCTACCGCGCCGGGCACATGTCCCGCCGCTCATATCCATAACCAAAGTGTCTCGAAGAAATCCAAAGGGGAACGAGA		106
ATGCACTGGACCTTGCTGCTTTTGGCAGAGACAAGAGCATCAAAATTTTCATGATCAGCTATACCGACCTGTTCCGGCGCCAAAGCGCC		196
M T L D L A A F A R D K S I K Y F M I S Y T D L F G G Q R A		30
AAGCTGGTCCCAGCAAGCCATCGCCGACATGCAGAAGGACGGCGCCGGCTTTGCAGGCTTTGCAACGTGGCTCGATCTGACGCGGGC		286
K L V P A E A I A D M Q K D G A G F A G F A T W L D L T P A		60
CATCCCCACTTGTTTGGCGTTCCCGATGCTTCTCCGTCATCCAATGGCCGGGAAGAAAGACGCTCGCATGGGTCCGCGCCGACATGCGTC		376
H P D L F A V P D A S S V I Q L P W K K D V A W V A A D C V		90
ATGGACGATCGGCCCTGCGAACAGCGCCGCGTGTCTGCTGAAAGACTGGTGGCTGCCGCTCGCAAGGAAGGCTCCGGGTGAAGACC		466
M D D R P V E Q A P R V V L K R L V A A A A K E G L R V K T		120
GGCTGGAGCCGAATCTTCTCATCTCTGCTGACGGTTCGGTGATTTCCAGACAGTTCGATACCGCGGAGAAGCCTTGCTACGACCAG		556
G V E P E F F L I S A D A G S V I S D Q F D T A E K P C Y D Q		150
CAGGCCGTGATGCGTGGTATGATGTCATCGCCGAGATCTGGGACTATATGCTGGAGCTCGGCTGGAAGCCCTATCAGAAGCATCAGCAG		646
C L A V M R R Y D V I A E I C D Y M L E L G W K P Y Q N D H E		180
GATCGCAACGGCCAGTTCGAGATGAACGGGAATATGACGATGCTCCTGAAGACCGCCGACAAGCACCTCTTCTCAAATTCATGCTCAAG		736
D A N G Q F E M N W E Y D D V L K T A D K H S F F K F M L K		210
TCGGTCGCCGAAAAGCAGCGCCTTCGCGCTACCTTCATCGCCGAAGCCCTTCAAGGCGCTGACCGGAAACGGTTCGCATGCGCACATCG		826
S V A E K H G L R A T F M P K F P K G L T G N G T C H A H I S		240
GCTGGGACGTGATGGAGGGTAAACGCCCTTCGGGACAAGGAAATGGCCCTTTGGGCTCTCGGCTCAGGGGAAACCTTTCTCGCGCGC		916
V W D V D G R V N A F A D K E M A F G L S A Q G K T F L G G		270
ATCATGAAGCAGCCCCCGCGTGGCCGCGATCACCAATCCGACGGTCAATTCCTACAAGCGCATCAAGCGCCGCGCACCCACCTCGSGT		1006
I M K H A P A L A A I T N P T V N S Y K R I N A P R T T S G		300
GCCACCTGGTCGCCCAACCCGTCGACATGGACGGGCAACACCCGACTCACATGGTCCGCGTCCCGGGCCCTGGGGCCTTCGAGTCCGC		1096
A T W S P N T V T W T G N N R T H M V R V P G P G R F E L R		330
CTGCCGACGGCGCGGTCATCCATACCTCTTGCAGGCGATCATCATCGCAGCCGCGCTCGAGGGCATCCGCGCCAGGCAGACCCCGCC		1186
L P D G A V N P Y L L Q A I I I A A G L E G I R S Q A D P G		360
CAGCATTACGATATCGATATGTATGCTGAGGGGACCTGGTGAAGACGCGCCGGCGCTGCCACTCAACCTGCTCGATGCACTGCGCGCC		1276
Q H Y D I D M Y A E G H L V K D A P R L P L N L L D A L R A		390
TTGATCGCCAGCAAGGCTTGAAGCGGCAATCGGGGCTGAGTTTCTCCGCTATCTCAAGCTCAAGCACCTGGAATGGAATGCCTAC		1366
F D A D E G L K A A I G A E F S S A Y L K L K H L E W N A Y		420
TGCTCGCATTCACCCAGTGGGAACGCGACGACGCTCGATATCTGAGCAGCGGACCGACTCTTGGCCATGCCGGGTTCGACAGCTC		1456
C S H F T Q W E R D S T L D I <	435	
GGCATGCCCGACTCTTATACTCGAAGCGCGAAGGAGAGACA		1500

Figura 17. Secuencia de nucleótidos del gene *gInt* y secuencia deducida de aminoácidos. Las bases sub-rayadas representan el sitio de unión al ribosoma. Las bases en negritas muestran parte de la secuencia de codificación del ORF2

107 hasta la posición 1414) y codifica para una proteína de 435 aminoácidos. Los primeros 7 aminoácidos coinciden con aquellos determinados químicamente de la proteína pura. El peso molecular deducido del polipéptido completo es de 48.2 kDa aproximadamente. Este peso molecular está muy relacionado con el peso molecular de 51 kDa obtenido por electroforesis desnaturante de la enzima purificada.

El DNA de la secuencia *glnT* de *R.l.phaseoli* tiene un contenido de G+C de 61% y exhibe un uso de codones que está fuertemente desviado hacia la presencia de G o C en la tercera posición. El 78% de los aminoácidos están codificados por este tipo de codones. De acuerdo al código genético, Leu y Ser son representados por seis posibles codones: En el caso de *glnT*, Leu fue codificada el 95% de las veces y Ser el 89% por codones que tienen C o G en la última posición. Características similares son presentadas por las secuencias *glnA* de *M capsulatus* (Cardy y Murrel, 1990) y de *A. brasilense* (Bozouklian y Elmerich, 1986) y la secuencia *glnI* de *Frankia* (Rochefort y Benson, 1990). En *C. acetobutylicum* (Janssen *et al.*, 1988) y *C. pasteurianum*, se ha encontrado un contenido de G+C de 28 % y en estos organismos los codones más frecuentemente usados tienen A o U en la tercera posición. En la secuencia *glnT*, se usaron 56 de los 64 codones posibles.

5. Secuencias regulatorias alrededor de *glnT*.

En la figura 17, también podemos ver que el ORF1 está

precedido por una secuencia consenso SD potencial (Shine y Dalgarno, 1976) 8 pb hacia el extremo 5' del fragmento desde el codón de iniciación ATG presuntivo.

En *E. coli* y *K. pneumoniae*, se ha mostrado que la expresión del gen *glnA* depende de un par de promotores dispuestos en tandem (Reitzer y Magasanik, 1985; Dixon, 1984). Como ya se mencionó (ver Introducción) *glnAp1* es una secuencia localizada en la posición -35 y -10 típica de los promotores reconocidos por σ^{70} , es reprimida por NtrC y requiere CAP y, *glnAp2* es una secuencia localizada en la posición -24 y -12 (Beynon *et al.*, 1983) reconocida por la subunidad σ^{54} , producto del gen *ntrA* (también llamado *rpoN* o *glnF*). En el análisis hecho a la región regulatoria hacia el extremo 5' de *glnT* no encontramos ninguna secuencia parecida a las secuencias promotoras descritas, probablemente debido a que no fue incluido en el fragmento de 2.4 kb o debido a que el gen tiene una localización interna en un operón policistrónico.

6. Homología de la secuencia de aminoácidos con otras GS's.

En la **figura 17** se presenta la secuencia de aminoácidos del ORF1 deducida a partir de la secuencia de nucleótidos. Se hicieron comparaciones de ésta, con la secuencia de aminoácidos de otras GS's reportadas (Rawlings, *et al.*, 1987 ; Janssen *et al.* 1988). En la tabla 4 se muestra el resultado de esta comparación, en donde se puede apreciar que la GS codifi-

cada por *glnT*, comparte un 31% de homología con la GS de *Bacillus subtilis* y *Clostridium acetobutylicum* (dos bacterias gram positivas) a lo largo de toda la cadena (430 aa) mientras que con el resto de las GS's consideradas, la homología a nivel

Cuadro 4. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de GSIII con la secuencia de aminoácidos de GS's de otras especies bacterianas.

GSIII vs:	% de homología	a lo largo de (aa)
<i>Bacillus subtilis</i>	30.3	439
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	31.2	442
<i>Anabaena</i> sp.	33.6	247
<i>Salmonella typhimurium</i>	35.6	264
<i>Escherichia coli</i>	35.6	264
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	32.7	263
<i>Azospirillum brasilense</i>	33.5	266
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	35.0	246

de la secuencia de aminoácidos es de aproximadamente el 33 a 35% en solo la segunda mitad del polipéptido.

En la GS de *E. coli*, se ha mostrado que la secuencia de aminoácidos alrededor del residuo de Tyr en la posición 397, es el sitio de adenilación (Shapiro y Stadtman, 1968). Las enzimas GS's de *E. coli*, *S. typhimurium*, *T. ferrooxidans* y *Anabaena*

sp. todas tienen un residuo Tyr en esta posición, mientras que *C. acetobutylicum*, *B. subtilis* tienen un residuo Phe (**Figura 18**). La subunidad de la GS de *S. typhimurium* muestra un residuo Trp-58 y que estéricamente está situado muy cerca del residuo Tyr-398 de la otra subunidad. Esto ha sugerido que la estructura tridimensional de esta región puede controlar la capacidad de una enzima para ser regulada por adenilación (Almassy *et al.*, 1986). Se sabe que la GS de *B. fragilis* no se adenila, no presenta el residuo Tyr en la posición relevante y carece del residuo Trp en la región I. La GSIII de *R.l.phaseoli*, tiene un residuo Tyr en esta posición, lo cual la hace un blanco potencial para la regulación por adenilación pero no presenta el residuo Trp en la región I (**figura 19**). Las enzimas de GS que se sabe se adenilan, muestran fuerte homología en los 18 aminoácidos adyacentes. Por medio de ensayos in vitro, se ha mostrado que la GS de *Anabaena* no se adenila (Fisher *et al.*, 1981) aunque contenga un residuo Tyr en esa posición. Es muy probable que esto se deba a las diferencias en la secuencia de aminoácidos aledañas al residuo Tyr (ver **figura 18**).

No sabemos si la enzima GSIII es susceptible de ser adenilada por el sistema de adenilación de UNF1811 debido a la carencia de la actividad de transferasa de esta enzima in vitro. Aunque en la secuencia aminoacídica deducida de la GSIII de *R.l.phaseoli* se encuentre un residuo Tyr en esta posición, la homología con los 18 aminoácidos aledaños es pobre con respecto a la GS de *E. coli*. Esto nos permite predecir la proba-

DOMINIO BLANCO DE LA ADENILACION



RP: R. l. phaseoli;

St: Salmonella typhimurium;

An: Anabaena sp;

Bs: Bacillus subtilis;

Ec: Escherichia coli;

Ca: Clostridium acetobutylicum.

Tf: Thiobacillus ferrooxidans;

↓ residuo de tirosina blanco de la adenilación

Figura 18. Alineación de la región de adenilación de GS's de diferentes fuentes. La flecha indica el residuo Tyr susceptible ser adenilado.

CODIGOS:

Comparación de las secuencias de aminoácidos de las 5 regiones de homología de las enzimas GS de *Phaseolus vulgaris* (Pv), Hamster chino (Ch), Alfalfa (Af), *Bradyrhizobium japonicum* (Bj), *Thiobacillus ferrooxidans* (Tf), *Escherichia coli* (Ec), *Anabaena* sp (An), *Salmonella typhimurium* (St), *Clostridium acetobutylicum* (Ca), *Streptomyces coelicolor* (Sc), *Bacillus subtilis* (Bs), *Bacteroides fragilis* (Bf) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Rp). Los aminoácidos son identificados por el código de una letra y los números indican la posición del primer aminoácido del alineamiento dentro de la cadena completa.

ble ausencia de regulación de la GSIII por adenilación. No obstante, es necesario llevar a cabo experimentos para evaluar este problema.

Rawlings *et al.* (1987) ha mostrado que la región 315-348 de la secuencia de aminoácidos de la GS de *E. coli*, esta altamente conservada (83%) entre las enzimas de *E. coli*, *Anabaena* y *T. ferrooxidans* y, en la GS de *C. acetobutylicum*, Janssen *et al.* ha encontrado una secuencia en la misma posición también altamente conservada (66%).

En la GSIII de *R.I.phaseoli*, también hemos detectado una región entre los aminoácidos 268 y 291 que tienen una 66% de homología a la región comprendida entre los aminoácidos 297 a 321 de la secuencia de GS de *E. coli*.

En *R.I.phaseoli*, se han encontrado dos isoenzimas de GS, GSI y GSII (Darrow y Knotts, 1977). GSI es una enzima típicamente procarionte, y se ha mostrado que GSII esta muy relacionada con las GS de eucariontes y carece de la porción C-terminal de la enzima procarionte que incluye el sitio de adenilación (Filser *et al.* 1986).

Rawlings *et al.* (1987), Janssen *et al.*(1988) han mostrado que todas las GS's de procariontes examinadas hasta ahora, comparten 5 regiones de alta homología (**figuras 19-23**) distribuidas a lo largo de toda la cadena y que tienen que ver con la conformación del sitio activo.

En la GSIII de *R.I.phaseoli*, se detectaron las 5 regiones aunque con distinto grado de homología. La región I de la GSIII

(figura 19) es la menos conservada de las 5 regiones (solo 7 de 33 aa) pero despliega algunos de los aminoácidos mas altamente conservados. Esta región carece del residuo Trp presente en las GS's restantes y tiene un residuo Glu en esta posición. Se supone que el residuo Trp completa el sitio activo formado entre subunidades adyacentes (Almassy *et al.* 1986; Janson *et al.* 1986; Rawlings *et al.* 1987). En la region I de las GS's de *C. acetobutylicum*, de *Streptomyces coelicolor* y de *B. subtilis* (bacterias Gram-positivas) el residuo Trp, ha sido reemplazado por un residuo Phe y, por un residuo Val en la GS de *B. fragilis* (Hill *et al.*, 1989). La GSIII de *R.l.phaseoli* no muestra el residuo Trp en esta posición, una característica compartida con las GS's de bacterias Gram-positivas.

En las enzimas GSI y GSII, las regiones II a IV están asociadas con los dos Mn^{2+} de una subunidad (Janson *et al.*, 1986). La región II (figura 20) de la mayoría de las GS's procariontes analizadas, contiene 4 aminoácidos conservados no contiguos [EV(X₃₋₄)Q(X₁)E]. Esta región está altamente conservada en la GSIII de *R.l.phaseoli* excepto que la Val ha sido reemplazada por un Asp.

La región III, se piensa que es el sitio de unión del ATP, ya que se asemeja a la secuencia **KX₄GX₂GXGKT** encontrada en varias proteínas que pegan ATP (Tischer *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1982). En la figura 21 podemos observar que ésta es la región mas altamente conservada en todas las GS examinadas incluyendo las GS de eucariontes y la GSIII de *R.l.phaseoli*

REGION I

Pv 53	N	Y	D	G	S	S	T	G	Q	A	P	G	Q	-	S	E	U	I	I	Y	P	Q	A	-	-	I	P	K	S	E	F	R	
Ch 61	N	F	D	G	S	S	T	F	Q	S	E	G	S	N	-	S	D	M	Y	L	S	P	U	A	-	-	M	F	R	D	P	F	R
Af 54	N	Y	D	G	S	S	T	G	Q	A	P	G	E	D	-	S	E	U	I	I	Y	P	Q	A	-	-	I	F	K	D	P	F	R
BJ 42	G	D	G	S	S	T	Q	Q	A	E	G	H	S	-	S	D	C	U	L	K	P	U	A	-	-	U	F	P	D	A	A	R	
Tf 51	A	F	D	G	S	S	A	G	W	K	G	N	E	S	D	M	I	L	L	P	D	P	D	S	A	U	L	D	P	F	M		
Ed 49	M	F	D	G	S	S	G	G	W	K	G	N	E	S	D	M	U	L	N	P	D	A	S	T	A	V	I	D	P	F	F		
An 50	P	F	D	G	S	S	R	G	W	K	A	N	E	S	D	M	T	M	L	D	P	N	T	A	W	I	D	P	F	M			
St 50	M	F	D	G	S	S	G	G	W	K	G	N	E	S	D	M	U	L	M	P	D	A	S	T	A	V	I	D	P	F	F		
Ca 51	M	F	D	G	S	S	D	C	F	V	R	E	E	S	D	M	N	L	R	P	N	L	D	S	F	V	I	F	P	W	R		
Bs 51	M	F	D	G	S	S	E	C	F	V	R	E	E	S	D	M	Y	L	Y	P	D	L	N	T	F	V	I	F	P	W	T		
So 48	A	F	D	G	S	S	R	G	F	Q	A	H	E	S	D	M	S	L	R	P	D	L	S	T	A	R	V	D	P	F	R		
*Rp 47	G	A	C	F	A	T	N	L	D	L	T	P	A	H	P	D	L	F	A	V	P	D	A	S	S	V	I	Q	L	P	W	K	
Bf 149	A	W	D	G	S	S	P	A	F	U	U	D	T	T	L	C	I	P	T	I	F	I	S	Y	T	G	E	A	L	D	Y	K	T

Figura 19. Región I de homología. Las enzimas de GS que se adenilan, muestran fuerte homología en esta región.

REGION II

Pv 190	G	E	U	M	P	-	G	Q	W	E	F	Q	U
Ch 195	A	E	U	M	P	-	A	Q	W	E	F	Q	I
Af 191	G	E	U	M	P	-	G	Q	W	E	F	Q	I
BJ 171	A	E	U	A	K	-	G	Q	W	E	F	Q	I
Tf 211	H	E	V	A	T	A	G	Q	H	E	I	G	U
Ec 212	A	E	V	A	T	A	G	Q	L	E	V	A	T
An 215	H	E	V	A	T	G	G	Q	C	E	L	G	F
St 215	H	E	V	A	T	A	G	Q	N	E	V	A	T
Ca 187	H	E	V	A	E	-	G	Q	N	E	I	D	F
Bs 188	H	E	V	A	P	-	G	Q	H	E	I	D	F
Sc 212	H	E	V	G	T	A	G	Q	A	E	I	N	Y
Bf 286	N	E	V	A	P	-	N	Q	F	E	L	A	P
* Rp 179	H	E	D	A	N	-	G	Q	F	E	M	N	W

Figura 20. Región II de las GS's que unen los iones Mg^{2+} . Esta región está altamente conservada en todas las glutamina sintetasas de procariontes.

REGION III

Pv 232	S	F	D	E	N	R	I	K	G	D	-	-	W	N	E	G	A	H	T	N	Y	S	T
Ch 238	T	F	D	P	K	R	I	P	G	N	-	-	W	N	E	G	A	H	T	N	Y	S	T
Af 233	S	F	D	P	K	R	I	K	G	E	-	-	W	N	E	G	A	H	T	N	Y	S	T
BJ 213	E	F	H	C	K	R	L	-	C	D	T	D	W	N	E	G	A	H	A	N	F	S	T
Tf 254	L	F	M	P	K	R	V	V	G	D	-	-	-	N	E	G	A	H	U	H	Q	S	T
Ed 256	T	F	D	P	K	R	M	F	G	D	-	-	-	N	E	G	A	H	C	H	M	S	T
An 257	T	F	D	P	K	R	I	F	G	D	-	-	-	N	E	G	A	H	C	H	Q	S	T
St 258	T	F	D	P	K	R	M	F	G	D	-	-	-	N	E	G	A	H	C	H	M	S	T
Ca 229	S	F	D	P	K	R	I	F	G	I	-	-	-	N	E	G	A	H	U	N	M	S	T
Bs 230	T	F	D	P	K	R	L	F	G	U	-	-	-	N	E	G	A	H	C	N	L	S	T
So 252	L	F	M	P	K	R	I	F	G	E	-	-	-	N	E	G	A	H	U	H	Q	S	T
Bf 327	L	F	H	E	K	R	Y	N	G	U	-	-	-	N	E	G	A	H	N	N	W	S	T
* Rp 221	L	F	M	P	K	R	F	K	G	L	-	-	-	T	S	N	C	H	A	H	I	S	T

Figura 21. Región III de homología en las glutamino sintetas. Se propone que ésta región es la responsable de la unión del ATP.

(aminoácidos 221-241).

En base a toda esta información se podría proponer como consenso para la región III de las GS de procariontes a la siguiente secuencia: **FMPKPX₂GX₂GXGXHX₃S**.

La región IV se considera como el sitio que pega Glu debido a que es similar a la secuencia **DRGASIV** encontrada en la glutamato deshidrogenasa de pollo y de bovino de la posición 18 a 24. Esta región se encuentra cercana al residuo de K-27 que esta implicado en el enlace del Glu (Moon y Smith, 1973).

De todas las secuencias alineadas, solo la región IV de la GS de *B. japonicum* tiene una secuencia idéntica a las de la GDH, excepto que al residuo V precede al residuo R. Este residuo R está conservado en las regiones IV de todas las GS examinadas. Por otro lado, donde el residuo V no está conservado, este ha sido reemplazado por un residuo de I (**figura 22**). Es importante hacer notar que la región IV de la GSIII, comprendida entre las posiciones 313-322, también está poco conservada y comparte 4 de los 10 aa que forman esta región. Todas las secuencias comparten un residuo N adyacente al residuo R excepto en *B. japonicum* donde este es reemplazado por un residuo D. La región IV de la GS de *B. fragilis*, no muestra homología al resto de las GS's.

La región V de la GSIII está comprendida entre los aminoácidos 327-343. Esta región está altamente conservada en todas las GS alineadas y la homología entre las GS de procariontes es aún mayor que entre las GS de procariontes y

REGION IV

FU 308	A	N	E	R	G	A	S	T	E	R	U	G
Ch 317	A	N	E	R	S	E	A	S	E	R	I	P
Af 309	A	N	E	R	G	A	S	T	E	R	U	G
BJ 260	A	D	E	R	G	A	S	T	E	R	U	P
Tf 336	K	N	E	R	S	E	A	S	E	R	I	P
Ec 339	R	N	E	R	S	E	A	S	E	R	I	P
An 341	G	N	E	R	S	E	A	S	E	R	I	P
Sf 341	R	N	E	R	S	E	A	S	E	R	I	P
Ca 313	K	N	E	R	T	A	L	E	R	U	P	
Bs 314	Q	N	E	R	S	P	L	E	R	I	P	
So 337	R	N	E	R	S	E	A	M	E	R	I	P
*Rp 313	N	N	E	R	T	H	M	U	R	U	P	

Figura 22. Región IV de homología dentro de las GS's, la cual se propone una glutámico.

eucariontes. Las GS de eucariontes despliegan una alta homología entre ellas. Los residuos E, R y P de esta región, están conservados en todas las enzimas GS (**figura 23**).

REGION V

Pv	328	F	D	R	R	P	A	S	N	M	D	P	E	V	U	U	T	S	
Ch	336	F	D	R	R	P	S	A	N	C	D	P	F	A	U	T	E		
Af	329	F	D	R	R	P	S	S	N	M	D	P	E	V	U	U	T	S	
BJ	260	L	E	D	R	R	P	N	S	Q	G	D	P	I	Q	I	V	R	
Tf	355	I	E	U	R	F	P	D	S	T	A	N	P	E	V	L	A	F	S
Ec	358	I	E	U	R	F	P	D	P	A	A	N	P	E	V	L	C	F	A
An	361	L	E	U	R	C	P	D	A	T	S	N	P	E	V	L	A	F	S
St	361	I	E	U	R	F	P	D	P	A	A	N	P	E	V	L	C	F	A
Ca	331	U	E	L	R	C	P	D	P	S	S	N	P	E	V	L	U	L	A
Bs	332	U	E	U	R	S	U	D	P	A	A	N	P	E	V	L	A	L	S
Sc	357	U	E	F	R	A	P	D	A	S	G	N	P	E	V	L	A	F	S
Bf	471	F	E	F	R	A	R	G	S	S	A	N	C	A	A	A	M	I	
* Rp	327	F	E	L	R	L	P	D	G	A	U	N	P	E	V	L	L	Q	A

Figura 23. Región V de homología entre las GS's alineadas. Esta región tiene que ver con en enlace del Mg^{2+} necesario para la actividad.

DISCUSION

La presencia de dos isoenzimas de GS aparentemente no está limitada a las bacterias de la familia Rhizobiaceae sino que parece ser que su presencia se ha extendido a diversos microorganismos del suelo como *Frankia* sp. (Rocheftort y Benson, 1990) y varias especies de *Streptomyces* (Kumada *et al.*, 1990).

La información acerca de la presencia de una tercera GS en otras Rhizobiaceae son limitados. Evstigneeva *et al.* (1983) han proporcionado evidencia sobre la presencia de tres isoformas de GS en *Rhizobium lupini*, y Kumar y Rao (1986), han separado por medio de metodos cromatográficos tres formas de GS en diversas especies de *Rhizobium* entre ellas *R.l.phaseoli* sin embargo no se aporta ninguna base genética de estos resultados.

Una secuencia capaz de complementar auxotrofia para glutamina de *E. coli*, ha sido aislada de *R. meliloti* (de Bruijn *et al.*1989) y de *Agrobacterium tumefaciens* (Rossbach *et al.* 1986). Sin embargo, en estas cepas complementadas no se pudo detectar actividad de GS en extractos crudos. Por lo tanto, la identidad de la proteina para la cual codifica queda por ser aclarada.

Somerville *et al.*(1989) han reportado recientemente la obtención de una cepa de *R. meliloti* con mutaciones estructurales en los genes *glnA* y *glnII*, los cuales codifican para GS I y GS II, respectivamente. Esta doble mutante no es un

auxótrofo estricto para glutamina, ya que pudo crecer en medios que contenían glutamato y amonio como fuente de nitrógeno. Este dato sugiere la presencia de una tercera GS. La actividad responsable para la carencia de auxotrofia de esta doble mutante ha sido purificada y sus propiedades cinéticas han sido determinadas (Liu, *et al.* 1990). Estos datos indican que en la doble mutante de *R. meliloti* se expresa una GS distinta a GSI y GSII y que anticuerpos dirigidos contra esta enzima, dan reacción cruzada contra un polipéptido de 48 kDa expresado en pFB6162, que lleva clonado la secuencia *glnT* de *R. meliloti*.

En un artículo previo se reportó la identificación, aislamiento, clonación y expresión de la secuencia *glnT* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, homóloga a *glnT* de *R. meliloti* (Espín *et al.*, 1990). Este gen complementa la auxotrofia para glutamina de la cepa *Klebsiella pneumoniae* UNF1811 (ver artículo adjunto).

En este trabajo reportamos la purificación y caracterización de la enzima expresada en *K. pneumoniae* UNF1811 (una auxótrofa para glutamina), así como la producción de anticuerpos específicos contra la proteína nativa y contra la proteína desnaturizada con el fin de conocer la identidad de esta GS y el papel que pudiese jugar dentro del metabolismo nitrogenado de *R.l.phaseoli*.

Los estudios anteriores llevados a cabo en nuestro

laboratorio indican fuertemente que la secuencia *glnT* codifica para una nueva glutamina sintetasa porque complementa la auxotrofia para glutamina de la cepa *K. pneumoniae* UNF1811, el producto proteico tiene actividad biosintética de GS. Además, en experimentos anteriores se ha mostrado que la secuencia *glnT* no hibridiza ni con *glnA* de *R.l.phaseoli* ni con el gen *glnII* de *Bradyrhizobium japonicum* (Espín *et al.*, 1990) y que, anticuerpos producidos contra esta proteína no cruzan con la GSI ni con la GSII de *R.l.phaseoli*. El hecho de que la secuencia de los primeros siete aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína purificada coincide con aquella deducida de la secuencia de nucleótidos nos permite concluir que, efectivamente, este locus codifica para una enzima GS de *R.l.phaseoli* descartando la posibilidad de que el fragmento clonado en pMW5 (o pGE203) funcione como activador de un gen de GS críptico en *K. pneumoniae*.

La proteína purificada de la cepa complementada de *K.pneumoniae*, esta compuesta de monómeros idénticos de 51,000 Da de peso molecular obtenido por electroforesis desnaturalizante y acuerda muy bien con el peso molecular de 49 kDa deducido de la secuencia de nucleótidos por medio del código genético. Por experimentos de centrifugación en gradientes de sacarosa usando como marcador la GSI de *R.l.phaseoli*, podemos decir que la enzima en su estado nativo es dodecamérica en estructura. Aunque la centrifugación en gradientes de sacarosa no es un método preciso para determinar peso molecular oligomérico de

una proteína, como lo es la filtración en gel con marcadores apropiados, si nos puede dar una idea de el peso molecular de la enzima. Para la GSIII de *R. meliloti* se ha estimado un peso molecular de 48, 000 Da por electroforesis desnaturizante con una estructura oligomérica de 8 subunidades (Liu, *et al.* 1990). GSIII de *R.l.phaseoli*, al igual que la GSIII de *R. meliloti* es termoestable a 50°C durante una hora y tiene una temperatura óptima de actividad de 60°C. No podemos evaluar el significado biológico de esta última propiedad.

Los anticuerpos producidos contra esta enzima no presentan reacción cruzada con GSI ni con GSII de *R.l.phaseoli*, y sabemos que el gen responsable de su síntesis no tiene homología con *glnA* de *R.l.phaseoli* ni con *glnII* de *Bradyrhizobium japonicum*, los genes estructurales de GSI y GSII respectivamente (Espín *et al.*, 1990). Adicionalmente, anticuerpos anti-GSI de *R.l.viceae*, no muestran reacción cruzada contra GSIII de *R.l.phaseoli*.

Una característica interesante es que tiene alta actividad biosintética pero carece o presenta una muy baja actividad de transferasa y, en contraste a las dos isoenzimas restantes encontradas en Rhizobiaceas, esta actividad biosintética no se puede detectar en geles nativos como sucede con la GSI y la GSII. El hecho de no poder detectar la actividad en geles nativos pudiere deberse a la disociación de la estructura oligomérica activa de la enzima o a la separación, durante la electroforesis, de algún cofactor esencial para la actividad.

Todos estos datos tomados en conjunto sugieren que las tres isoenzimas son distintas desde el punto de vista genético y bioquímico.

Las propiedades cinéticas determinadas para esta enzima resultan interesantes desde el punto de vista catalítico con respecto a otras GS's, ya que su alta afinidad por ATP ($K_m=0.087\text{mM}$) su baja afinidad por glutamato ($K_m=16.0\text{ mM}$) y su afinidad intermedia por hidroxilamina ($K_m= 4\text{ mM}$) sugieren que esta enzima podría funcionar bajo condiciones muy particulares. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos recientemente para *R. meliloti* y reportados por Liu *et al.* (1990).

La búsqueda de GSIII en *R.l.phaseoli* es importante debido a que nuestro objetivo es estudiar la expresión y actividad de la enzima en este organismo. Este problema se evaluó por medio de técnicas inmunológicas como Western y experimentos de doble difusión. Los resultados obtenidos por medio de estas técnicas, muestran que *R.l.phaseoli* no expresa esta proteína bajo las condiciones probadas. Solo pudimos detectar este antígeno en extractos de la cepa complementada.

Las explicaciones posibles para este resultado son:

1. el gen *glnT* puede ser críptico y se ha mantenido en el genoma debido a que forma parte de una región metabólicamente importante para *R.l.phaseoli*, o que

2. este gen solo se expresa bajo circunstancias genéticas y/o bioquímicas particulares que hasta ahora hemos sido incapaces de determinar. En este sentido sería interesante saber si una doble mutación en otras Rhizobiaceas que contengan la secuencia *glnT* (como *R.l.phaseoli* y *Agrobacterium* sp.), es una condición necesaria para poder detectar la actividad enzimática de GSIII.

3. también es posible que la alta actividad biosintética de esta enzima pudiere ser tóxica para esta bacteria, como ha sido mostrado para *S. typhimurium* (Kustu *et al.*, 1984) debido a la baja de las pozas de glutamato y/o ATP de la célula.

Con los resultados presentados en este trabajo no se puede descartar ninguna de las hipótesis antes mencionadas, pero si podemos decir que en las condiciones metabólicas y genéticas bajo las cuales se hicieron los experimentos no está presente el antígeno ni la actividad de esta proteína.

No podemos explicar el hecho de que los anticuerpos anti-GSIII de *R.l.phaseoli* no cruzaran contra el extracto de una cepa de *E. coli* que porta el plásmido pFB6162 con el gen de GSIII de *R. meliloti*, aunque pudiere ser que la identidad de las dos enzimas es distinta o que los niveles de la proteína son extremadamente bajos como para ser detectados. Por otro lado, anticuerpos anti-GSIII de *R. meliloti* no muestran reacción cruzada contra la GSIII de *R.l.phaseoli* (datos no mostrados). Esta última observación apoya la idea de que ambas proteínas

son lo suficientemente diferentes como para no mostrar reacción cruzada.

Indudablemente, la inactivación de los genes que codifican para GSI y para GSII por mutagénesis dirigida y la expresión de la secuencia *glnT* en esta cepa doble mutante de *R.l.phaseoli* nos permitirá evaluar el papel que esta enzima juega dentro del metabolismo nitrogenado de *Rhizobium* tanto en vida libre como en estadio de bacteroide.

En *R. meliloti*, contrariamente a lo encontrado en *B. japonicum* (Carlson *et al.* 1987), una doble mutante *glnA glnII* no es un auxótrofo para glutamina y es Nod+Fix+. No sabemos el papel que el producto de *glnT* pudiese jugar en estas mutantes. Suponiendo que en *B. japonicum* no existe una secuencia *glnT* (aunque no se sabe que se haya explorado esta posibilidad) es probable que la auxotrofia y el fenotipo simbiótico de esta cepa se deba a la carencia de este gen.

En este sentido es necesario destacar que en *R. meliloti*, una actividad semejante a la de GSIII, solo se ha podido detectar en una cepa que carece tanto de GSI como de GSII y en medio mínimo con glutamato y amonio como fuente de nitrógeno (Somerville *et al.*, 1989). La caracterización de la actividad biosintética remanente de GS en la doble mutante de *R. meliloti*, así como del origen genético de las demás enzimas GSIII reportadas para Rhizobiaceae, nos permitirá conocer la identidad de cada una de estas enzimas.

La gran termoestabilidad (1 h a 50°C) y la alta temperatura óptima (alrededor de 60°C), de esta enzima, sugiere un alto contenido de alpha-hélice dentro de su estructura secundaria. Este resultado coincide con aquel reportado por Liu *et al.*(1990) para la GSIII de *R. meliloti*. Los datos de secuencia de nucleótidos de este gen y de la secuencia de aminoácidos deducida obtenidos recientemente en nuestro laboratorio junto con la aplicación de programas de computadora para el análisis, favorecen esta hipótesis.

La localización de esta enzima en una electroforesis de doble dimensión (1a. dimensión por Isoelectroenfoque; 2da. dimensión por peso molecular) indica un punto isoelectrónico entre 6.0 y 6.2. No existen datos con respecto a esta propiedad para la GSIII purificada de *R. meliloti*.

La identificación de secuencias homólogas a *glnA*, y *glnII* en otros organismos del suelo además de las Rhizobiaceae, indica que la asimilación de amonio y la síntesis de glutamina en estos organismos es un problema fundamental y han desarrollado mecanismos para contender con él. Se desconoce el significado biológico de la presencia de más de una isoenzima de GS. La identificación de una nueva GS en Rhizobiaceae, y la purificación de su producto proteico, hace interesante los estudios sobre la asimilación de amonio en microorganismos que poseen mas de una isoenzima de GS.

El análisis de secuencia muestra que *glnT* forma parte de un operón en el que está incluido un gen con alta homología a *purB*. Se sabe que, en *E. coli*, este gen codifica para una enzima que está involucrada en la biosíntesis de inosin-monofosfato, un precursor de purinas (Koduri y Gots, 1980) y también se sabe que la glutamina es el precursor de todos los átomos de N presentes en estos compuestos. Sería interesante estudiar la relación que pudiere existir en la asociación de estos dos genes (*glnT* y *purB*) en *R.l.phaseoli*.

Una pregunta que queda sin respuesta es: que relación existe entre las enzimas GSIII encontradas por Kumar y Rao (1986), por Evstigneeva *et al.* (1983), por Shatters (1989) y por nosotros?. La respuesta a esta pregunta arrojaría luz sobre este problema.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos experimentalmente y aquellos obtenidos por medio del análisis de la secuencia de nucleótidos y de su secuencia de aminoácidos deducida confirman que la secuencia clonada en pGE203 (o pMW5a) contiene un gen *glnT* de *R.l.phaseoli* que codifica para una GSIII, distinta a GSI y GSII.

Desde el punto de vista inmunológico, se ha mostrado que anticuerpos dirigidos contra GSIII no muestran reacción cruzada contra GSI ni contra GSII, lo que nos habla de enzimas inmunológicamente distintas.

Desde el punto de vista bioquímico, las propiedades cinéticas de la GSIII son diferentes a las de las GS's estudiadas. Su alta afinidad por ATP la hace una enzima avida por este metabolito.

Desde el punto de vista molecular, los genes que codifican para GSI, GSII y GSIII (*glnA*, *glnI* y *glnT*, respectivamente), no hibridizan entre si (Espín *et al.*, 1990).

Desde el punto de vista metabólico, la actividad de GSI y la de GSII se pueden detectar experimentalmente cuando la bacteria crece en medio mínimo con glutamato como fuente de nitrógeno y succinato como fuente de carbono. La actividad de GSIII, no se puede detectar bajo ninguna de las condiciones probadas. Por otro lado, el análisis de secuencia nos ha permitido identificar las 5 regiones propuesta presentes en la secuencia de aminoácidos de las GS's de otros organismos. En base a estos datos, sería interesante saber acerca de las relaciones evolutivas existentes entre las tres GS's.

REFERENCIAS

Adams TH, and BK Chelm (1988). Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J Gen Microbiol 134: 611-618.

Adler SP, D Purich, and ER Stadtman (1975). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the P_{II} regulatory protein and the uridylyl transferase-uridylyl-removing enzyme. J. Biol. Chem. 250: 6264-6272.

Albright LM, E Huala, and FM Ausubel (1989). Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator proteins pairs. Ann Rev Genet 23: 311-336.

Almassy RJ, CA Janson, R Hamlin, NH Xuong, and D Eisenberg (1986). Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. Nature (London). 323: 304-309.

Bender RA, KA Jansen, AD Resnick, M Blumberg, F Foor, and B Magasanik (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 129: 1001-1009.

Bouzuklian H, and C Elmerich (1986). Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. Biochimie 68: 1181-1187.

Bower y Zalkin, (1983). Chemical modification and ligand binding studies with *Escherichia coli* glutamate synthase. *Biochem* 22: 1613-1620.

Brown CM, and MJ Dilworth (1975). Ammonium assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J Gen Microbiol* 86: 39-48.

Buck M, S Drummond, and R Dixon (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* 320: 374-378.

de Bruijn FJ, S Rossbach, M Schneider, P Ratet, S Messmer, WW Szeto, FM Ausubel, and J Schell (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 171: 1673-1682.

Cardy DLN, and JC Murrel (1990). Cloning, sequencing and expression of the glutamine synthetase structural gene (*glnA*) from the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Gen Microbiol* 136: 343-352.

Carlson TA, and BK Chelm (1986). Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature* 322: 568-570.

Carlson TA, ML Guerinot, and BK Chelm (1985). Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 162: 698-703.

Carlson TA, GB Martin, and BK Chelm (1987). Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 169: 5861-5866.

Chiurazzi M, and M Iaccarino (1990) Transcriptional analysis of the *glnB-glnA* region of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Mol Microbiol 4: 1727-1735.

Colonna-Romano, A Riccio, M Guida, R Defez, A Lamberti, M Iaccarino, U Priefer, and A Pühler (1987). Tight linkage of *glnA* and a putative regulatory gene in *Rhizobium leguminosarum*. Nucleic Acid Research 15: 1951-1963.

de Zamaroczy M, F Delorme, and C Elmerich (1990). Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet 224: 421-430.

Darrow RA, and RR Knotts (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living-root nodule bacteria. Biochem Biophys Res Comm 78: 554-559.

Dixon R, (1984). The genetic complexity of nitrogen fixation. J Gen Microbiol 130: 2745-2755.

Dixon R, C Kennedy, A Kondorosi, V Krishnapillai, and M Merrick (1977). Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. Mol Gen Genet 157: 189-198.

Dumbar, BS (1987). Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press. NY., USA.

Edmands J, NA Noridge, DR Benson (1987). The actinorrhizal root-nodule symbiont Frankia sp. strain Cpl1 has two glutamine synthetases. PNAS, USA. 84: 6126-6130.

Espín G, A Alvarez-Morales, and M Merrick (1981). Complementation analysis of the *glnA* linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Mol Gen Genet. 184: 213-217.

Espín G, S Moreno, M Wild, and R. Meza (1988). *Rhizobium phaseoli* glutamine synthetases. In: Bothe H, FJ de Bruijn, WE Newton (eds) Nitrogen fixation: One hundred years after. Gustav Fischer, New York p571.

Evstigneeva ZG, MV Kaush, KB Aseeva, and VL Kretovich (1983).

Multiple molecular forms of glutamine synthetase in *Rhizobium lupini* bacteroids. *Biokhimiya* 48: 405-408.

Filser MMK, C Moscatelli, A Lamberti, E Vincze, M Guida, G Salzano, and M Iaccarino (1986). Characterization and cloning of two *Rhizobium leguminosarum* genes coding for glutamine synthetase activities. *J Gen Microbiol* 132: 2561-2569.

Fisher R, R Tuli, and R Haselkorn (1981). A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylated. *PNAS* 78: 3393-3397.

Fuchs RL, and DL Keister (1980). Comparative properties of glutamine synthetase I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J Bacteriol* 144: 641-648.

García E, and SG Rhee (1983). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: purification and properties of P_{II}, uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. *J Biol Chem* 258:2246-2253.

Ginsburg A, and ER Stadtman (1973). Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. In Prusiner S, and RE Stadtman (eds). *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, Inc., New York p9.

Gussin GN, CW Ronson, and FM Ausubel (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann Rev Genet* 20: 567-591.

Halpern YS (1988). Control of transport and utilization of nitrogen sources in bacteria. In: Sanchez-Esquivel S. Nitrogen Source control and microbial processes. CRC Press. Boca Raton, Florida p21.

Hill RT, JR Parker, HJK Goodman, DT Jones, and DR Woods (1989). Molecular analysis of a novel Glutamine synthetase of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol* 135: 3271-3279.

Janson CA, PS Kayne, RJ Almassy, M Grunstein, and D Eisenberg (1986). Sequence of glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* and implications for the protein structure. *Gene* 6: 297-300.

Janssen PJ, WA Jones, DT Jones, and DR Woods (1988). Molecular analysis and regulation of the *glnA* gene of the Gram-positive anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 170: 400-408.

Keener J, and S Kustu (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the

conserved amino-terminal domain of NTRC. PNAS 85: 4976-4980.

Krishnan IS, RK Singhal, RD Dua (1986). Purification and characterization of glutamine synthetase from *Clostridium pasteurianum*. Biochem 25: 1589-1599.

Kumada Y, E Takano, K Nagaoka, and CJ Thompson (1990). *Streptomyces hygroscopicus* has two glutamine synthetases genes. J Bacteriol 172: 5343-5351.

Kumar PS, and SLN Rao (1986). Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to Rhizobia. Curr Microbiol 14: 113-116.

Kustu S, J Hirschman, D Burton, J Jelesko, and JC Meeks (1984). Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. Mol Gen Genet 197: 309-317.

Laemli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London. 227: 680-688.

Lewis TH, R Gonzalez, and JL Bostford (1990). *Rhizobium meliloti* glutamate synthase: cloning and initial characterization of the *glt* locus. J Bacteriol 172: 2413-2420.

Lipman DJ, and WR Pearson (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-1441.

Liu, RG Shatters, and ML Kahn (1990). Purification and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. In PM Gresshoff, L Evans Roth, G. Stacey, and WE Newton (Eds.); Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Proceedings of the 8th International Congress on Nitrogen Fixation. Knoxville, Tennessee, USA. May 20-26, 1990. p 556.

Lowry D, N Rosebrough, A Farr, and R Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Ludwig RA (1980). Physiological roles of glutamine synthetase I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp. 32H1. *J Bacteriol* 141: 1209-1216.

Magasanik B (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann Rev Genet* 16: 135-168.

Mantzala y Zalkin (1976). Properties of apoglutamate synthase and comparison with glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 251: 3300-3305.

Martin GB, MF Thomashow, and BK Chelm (1989). *Brady-*

rhizobium japonicum glnB, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. J Bacteriol 171: 5638-5645.

Martin GB, KC Chapman, and BK Chelm (1988). Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). J Bacteriol 170: 5452-5459.

Merrick MJ (1988). Nitrogen regulation of nitrogen fixation. In: Sanchez-Esquivel S. (ed) Nitrogen source control of microbial processes. CRC Press. Boca Raton Florida p169.

Mifflin BJ, and JV Cullimore (1984). Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: a joint endeavour. In: D.S.P. Verma and Th. Hohn (eds). Genes involved in microbe-plant interactions. Springer-Verlag. Vienna. pp129-196.

Minchin SD, S Austin, and RA Dixon (1989). Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nifLA promoter by *ntrC* is face-of-the-helix dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma 54-RNA polymerase with the promoter. EMBO J 8: 3491-3499.

Moon K, EL Smith (1973). Sequences of bovine liver glutamate dehydrogenase. VIII. Peptides produced by specific chemical

cleavage, the complete sequence of protein. J Biol Chem 248: 3082-3088.

Moreno S, ... (1991a).

Moreno S, R Meza, J Guzmán, A. Cárabez, and G. Espín (1991b). The *glnA* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and its role in symbiosis. MPMI 4: 000-000.

Morett E, S Moreno, and G Espín (1985). Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MS^s) mutants of *Rhizobium phaseoli*. Mol Gen Genet 200: 229-234.

Noel KD, A Sanchez, L Fernandez, L Leemans, and MA Ceballos (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J Bacteriol 158: 148-155.

O'Farrel PZ, HM Goodman, and PH O'Farrel (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 12: 1133-1142.

Rao VR, RA Darrow, and DA Keister (1978). Effects of oxygen tension on nitrogenase and on glutamine synthetase I and II in *Rhizobium japonicum* 61A76. Biochim Biophys Res Comm 81: 224-231.

Rawlings DE, WA Jones, EG O'Neill, and DR Woods (1987). Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene and its controlling region from the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *Gene* 53: 211-217.

Reitzer LJ, and B Magasanik (1985). Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated in tandem promoters. *PNAS* 82: 1979-1983.

Rendina RH and WH Orme-Johnson (1978). Glutamate synthase: on the kinetic mechanisms of the enzyme from *Escherichia coli* W. *Biochemistry* 17: 5388-5393.

Sanger F, S Nicklen and R Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.

Sasse-Dwight S, and JD Gralla (1988) Probing the *Escherichia coli glnALG* upstream activation mechanism in vivo. *PNAS* 85: 89-94.

Schreier HJ, SH Fisher, and AL Sonensheim (1985). Regulation of expression from the *glnA* promoter of *Bacillus subtilis* requires the *glnA* gene product. *PNAS* 82: 3375-3379.

Shapiro BM, and ER Stadtman (1968). 5'-adenosyl-O-tyrosine, the novel phosphodiester of adenylylated glutamine synthetase

from *Escherichia coli*. J Biol Chem 243: 3769-3771.

Shine C, and L Dalgarno (1976). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature 254: 34-38.

Robertson JG, KJF Farnden, MP Warburton, and JM Banks (1975). Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. Aust J Plant Physiol 2: 265-272.

Rocheffort DA, and DR Benson (1990). Molecular cloning, sequencing, and expression of the glutamine synthetase II (*glnII*) gene from the actinomycete root nodule symbiont *Frankia* sp. strain Cpl1. J Bacteriol 172: 5335-5342.

Ronson CW, B Tracy Nixon, LM Albright, and FM Ausubel (1987). *Rhizobium meliloti ntrA* (*rpoN*) gene is required for diverse metabolic Functions. J Bacteriol 169: 2424-2431.

Rossbach S, J Schell, and FJ de Bruijn (1988). Cloning and analysis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 loci involved in glutamine biosynthesis: neither *glnA* (GSI) nor the *glnII* (GSII) gene plays a role in virulence. Mol Gen Genet 212:38-47.

Rossbach S, J Schell, and FJ de Bruijn (1987). The *ntrC* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase (GSII) activity, growth on nitrate and chromosomal but not Ti-

encoded arginine catabolism pathways. Mol Gen Genet 209: 419-426.

Rosbach S, M Schneider, J Schell, and FJ de Bruijn (1988). Characterization of different glutamine synthetase genes of the Rhizobiaceae and their role in N-assimilation and plant-bacterial interactions. In Bothe H, FJ de Bruijn and WE Newton (eds) Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, New York p383.

Shatters RG, and ML Kahn (1989). Glutamine synthetase II in *Rhizobium*: reexamination of the proposed horizontal transfer of DNA from eukaryotes to prokaryotes. J Mol Evol 29: 422-428.

Shatters RG, JE Somerville, and ML Kahn (1989). Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. J Bacteriol 171: 5087-5094.

Somerville JS, and KL Khan (1983). Cloning of glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 156: 167-176.

Somerville JE, RG Shatters, and ML Kahn (1989). Isolation, characterization, and complementation of *Rhizobium meliloti* 104A14 mutants that lack glutamine synthetase II activity. J Bacteriol 171: 5079-5086.

Stadtman, ER., E Mura, PB Chock and SG Rhee (1980). The interconvertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase activity. p.41-59. In J. Mora and R. Palacios (eds). Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. Academic Press, Inc. NY.

Stock JB, AJ Ninfa, and AM Stock (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. Microbiol Rev 53: 450-490.

Su W, S Porter, S Kustu, and H Echols (1990). DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. PNAS 87: 5504-5508

Szeto WW, B Tracy Nixon, CW Ronson, and FM Ausubel (1987). Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* *ntrC* gene: *R. meliloti* has separated regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. J Bacteriol 169: 1423-1432.

Thöny B, H Hennecke (1989). The -24/-12 promoter comes age. FEMS Microbiol Rev 63: 341-358.

Tischer E, S DasSarma, and HM Goodman (1986). Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. Mol Gen

Genet 203: 221-229.

Tumer NE, SJ Robinson, and R Haselkorn (1983). Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. Nature 306: 337-342.

Tyler B (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann Rev Biochem 47: 1127-1162.

Walker JE, M Saraste, MJ Runwick, NJ Gay (1982). Distantly related sequences in α - and β -subunits of ATP synthetase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J 1: 945-951.

Weiss V, and B Magasanik (1988). Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR_I) of *Escherichia coli*. PNAS 85: 8919-8923.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología-UNAM con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.