

03062
18
2eje



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del Colegio de
Ciencias y Humanidades

PURIFICACION Y CARACTERIZACION
DE LA GLUTAMATO SINTASA DE
Saccharomyces cerevisiae,

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(BIOQUIMICA)

presenta:

BIOL. MARIA DE LOURDES VALENZUELA SANCHEZ

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTAMATO SINTASA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

Durante la asimilación del amonio en bacterias, hongos, algas y plantas superiores, intervienen las enzimas Glutamato deshidrogenasa (GDH), Glutamino Sintetasa (GS) y Glutamato Sintasa (GOGAT). El ciclo GS-GOGAT sirve para asimilar el amonio en forma de glutamina y glutámico.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad de GOGAT se detectó y semipurificó por primera vez por Roon y cols. (1974). Masters y Meister (1982) purificaron a homogeneidad la enzima, a partir de levadura para panificación, y obtuvieron un dímero de 265 kDa que comprende una subunidad de 169 kDa y otra de 61 kDa.

El presente trabajo describe la purificación y caracterización de una enzima GOGAT de levadura que no ha sido reportada en la literatura. Esta enzima es un trímero formado por monómeros de 199 kDa, similares en masa molecular a los descritos en otros organismos eucariontes. La actividad específica de la enzima, después de purificarla 357 veces, es de 14.3 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Los valores de K_m para glutamina, 2-oxoglutarato y NADH son 294 μM , 104 μM y 3.8 μM respectivamente. El valor de actividad específica de la enzima es óptimo en un amplio intervalo de pH entre 6.6 y 7.2. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la enzima mostró que existe una alta similitud con el amino terminal de enzimas GOGAT de diferentes especies; este resultado identifica a la proteína purificada como una enzima GOGAT. Los estudios de reacción cruzada con anticuerpos elaborados para las enzimas GOGAT de *Escherichia coli*, levadura y nódulos de alfalfa, mostraron que estas proteínas presentan diferentes epítopos antigénicos, a pesar de la similitud que existe entre su secuencia de aminoácidos. Por último, el análisis por inmunorreplicas tipo western permitió demostrar la presencia de la enzima de 199 kDa en la misma levadura usada por Masters y Meister (1982).

Los resultados de la purificación de la enzima GOGAT a partir de la cepa CN36, permiten proponer la existencia de una sola actividad de GOGAT de 199 kDa en *S. cerevisiae*. La secuencia de la región amino terminal permitirá la clonación del gen estructural y la obtención de cepas carentes de actividad de GOGAT. De esta manera se podrá determinar si existe una sola actividad de GOGAT y realizar estudios sobre el papel fisiológico de esta enzima.

A mis padres y a mis hermanos
con todo mi amor.

A Alicia con todo mi cariño, por la oportunidad
y la motivación que me brinda, porque emana
experiencia y el gusto por aprender como un
niño que tiene su pizarra en blanco, por la
lucha constante a pesar de los tropiezos.
Por todas las cosas que enseña y que
comparte aún sin darse cuenta.

A Diego con cariño y respeto, por su amistad y
por la formación académica que me brinda en
todo momento, por estar siempre al
pendiente de mi.

A Hiram, Cristina, Sandra, Lina, Lucia, Miriam
Claudia, Lichi, Beatriz y Felipe. Porque son
muy importantes.

Al alumnito Simón.

A mis amigos de toda la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la gente del IFC de la UNAM, a DGAPA y CONACyT por la estancia y el apoyo económico brindado durante mis estudios de Maestría.

A Alicia González, Diego González-Halphen, Jesús Aguirre Linares, Mauricio Díaz, Luis Servín y a Ernesto Guerrero por sus sugerencias en la corrección del manuscrito.

A Guadalupe Espín que formó parte de mi comité tutorial.

A Miriam Vázquez-Acevedo por su constante e invaluable asesoría técnica.

Al Ing. Abel Blancas por el crecimiento en el fermentador de los microorganismos que se emplearon en el presente trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de
Microbiología del Instituto de Fisiología Celular (UNAM),
bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez.

INDICE

RESUMEN	
I. INTRODUCCION	
1. Generalidades	1
2. Enzima Glutamato Sintasa de bacterias	3
3. Enzima Glutamato Sintasa de cianobacterias	14
4. Enzima Glutamato Sintasa de plantas	15
5. Enzima Glutamato Sintasa de hongos	20
6. Antecedentes	22
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIALES Y METODOS	26
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSION	50
VI. CONCLUSIONES	59
VII. PERSPECTIVAS	60
VIII. REFERENCIAS	61
APENDICE	65

ABREVIATURAS

CAPS	ácido 3-ciclohexilamino-1-propansulfónico
CD	dicroísmo circular
DEAE	dietilaminoetil
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPR	resonancia paramagnética electrónica
Fd	ferredoxina
GDH	glutamato deshidrogenasa
gdh ⁻	mutantes carentes de actividad de GDH
GOGAT	glutamina amida 2-oxoglutarato amidotransferasa
gogat ⁻	mutantes carentes de actividad de GOGAT
GS	glutamino sintetasa
MM	medio mínimo para levadura
NADH	adenina β-nicotinamida dinucleótido
NADPH	adenina β-nicotinamida dinucleótido 3'-fosfato
NN	medio mínimo para bacterias
PAGE	electroforesis en geles de acrilamida
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
SDS	dodecil sulfato de sodio
TLCK	Nα-p-tosil-L-lisina cloro metil cetona
ura3	mutantes auxótrofas de uracilo

RESUMEN

Durante la asimilación del amonio en bacterias, hongos, algas y plantas superiores, intervienen las enzimas Glutamato deshidrogenasa (GDH), Glutamino Sintetasa (GS) y Glutamato Sintasa (GOGAT). El ciclo GS-GOGAT sirve para asimilar el amonio en forma de glutamina y glutámico.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad de GOGAT se detectó y semipurificó por primera vez por Roon y cols. (1974). Masters y Meister (1982) purificaron a homogeneidad la enzima, a partir de levadura para panificación, y obtuvieron un dímero de 265 kDa que comprende una subunidad de 169 kDa y otra de 61 kDa.

El presente trabajo describe la purificación y caracterización de una enzima GOGAT de levadura que no ha sido reportada en la literatura. Esta enzima es un trímero formado por monómeros de 199 kDa, similares en masa molecular a los descritos en otros organismos eucariontes. La actividad específica de la enzima, después de purificarla 357 veces, es de 14.3 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Los valores de K_m para glutamina, 2-oxoglutarato y NADH son 294 μM , 104 μM y 3.8 μM respectivamente. El valor de actividad específica de la enzima es óptimo en un amplio intervalo de pH entre 6.6 y 7.2. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la enzima mostró que

existe una alta similitud con el amino terminal de enzimas GOGAT de diferentes especies; este resultado identifica a la proteína purificada como una enzima GOGAT. Los estudios de reacción cruzada con anticuerpos elaborados para las enzimas GOGAT de *Escherichia coli*, levadura y nódulos de alfalfa, mostraron que estas proteínas presentan diferentes epítopos antigénicos, a pesar de la similitud que existe entre su secuencia de aminoácidos. Por último, el análisis por inmunorreplicas tipo western permitió demostrar la presencia de la enzima de 199 kDa en la misma levadura usada por Masters y Meister (1982).

Los resultados de la purificación de la enzima GOGAT a partir de la cepa CN36, permiten proponer la existencia de una sola actividad de GOGAT de 199 kDa en *S. cerevisiae*. La secuencia de la región amino terminal permitirá la clonación del gen estructural y la obtención de cepas carentes de actividad de GOGAT. De esta manera se podrá determinar si existe una sola actividad de GOGAT y realizar estudios sobre el papel fisiológico de esta enzima.

I. INTRODUCCION

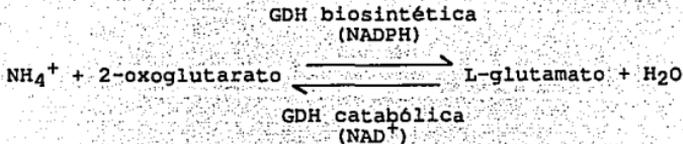
1. Generalidades

El nitrógeno que utiliza la célula para la síntesis de sus compuestos nitrogenados se requiere en forma reducida. Los organismos superiores son incapaces de reducir el N_2 a NH_4^+ . Esta conversión se lleva a cabo por bacterias y algas verde-azules y se denomina fijación de nitrógeno. Algunos de estos microorganismos invaden las raíces de las plantas leguminosas y forman nódulos donde ocurre la fijación de nitrógeno. Así se obtiene el NH_4^+ que suplementa de nitrógeno tanto al microorganismo como a la planta.

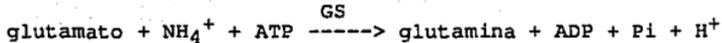
El siguiente paso en el metabolismo del nitrógeno en biomoléculas es la asimilación de NH_4^+ en los aminoácidos glutamato y glutamina. Estos dos compuestos donan sus grupos amino y amido para la síntesis de otros aminoácidos, purinas, pirimidinas, aminoazúcares y otras moléculas nitrogenadas. El grupo α -amino de la mayoría de los aminoácidos proviene del grupo α -amino del glutamato. La glutamina dona su nitrógeno de la cadena lateral por transamidación.

El glutamato se sintetiza a partir de NH_4^+ y 2-oxoglutarato por la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH). En la dirección

biosintética de la reacción, el NADPH es el reductor, mientras que el NAD⁺ es el oxidante en la dirección catabólica:



El ión amonio se incorpora a la glutamina por la acción de la Glutamino Sintetasa (GS) sobre el glutamato. Esta reacción de amidación se lleva a cabo con la hidrólisis de ATP y es irreversible.



Las enzimas GDH y GS están presentes en todos los organismos. En bacterias, algas, hongos y plantas superiores se encuentra también la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT) (glutamina (amida):2-oxoglutarato (NADP⁺) amidotransferasa oxidoreductasa) que cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato. El donador de nitrógeno en esta reacción es la glutamina, la que al donar su grupo amido queda como glutamato, por lo que el resultado final es la formación de dos moléculas de glutamato.

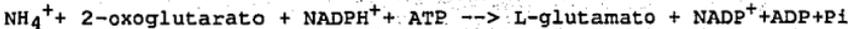


La biosíntesis de glutamato en bacterias, algas, hongos y plantas superiores se lleva a cabo por la enzima GDH, o por la acción conjunta de las enzimas GS y GOGAT. La enzima GS provee la glutamina necesaria para que la enzima GOGAT sintetice glutamato. Una de las moléculas de glutamato, sintetizadas por la enzima GOGAT, es utilizada por la enzima GS para sintetizar de nuevo glutamina. Por esta razón a esta secuencia de reacciones se le denomina ciclo GS-GOGAT.

2. Enzima Glutamato Sintasa de bacterias.

La enzima GOGAT se encontró por primera vez en *Klebsiella aerogenes* (Tempest y cols., 1970; Meers y cols., 1970). Esta enzima se ha purificado a partir de *E. coli* (Miller y Stadtman, 1972; Mäntsäla y Zalkin, 1976a; Mäntsäla y Zalkin, 1976b), *Klebsiella aerogenes* (Trotta y cols., 1974; Geary y Meister, 1977), *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mäntsälä, 1978); *Azospirillum brasilense* (Ratti y cols., 1985; Vanoni y cols., 1990) *Rhodospirillum rubrum* (Yelton y Yoch, 1981; Carlberg y Nordlund, 1991), y *Bacillus licheniformis* (Schreier y Bernlohr, 1984), entre otras, encontrándose que todas ellas presentan características similares a la enzima GOGAT de *E. coli*.

En bacterias, cuando el nitrógeno es limitante, la mayoría del glutamato se sintetiza por el ciclo GS-GOGAT. La suma de estas reacciones, según Miller y Stadtman (1972), es:



Cuando se crece a *Klebsiella aerogenes* bajo condiciones limitadas de amonio la reacción reversible de GDH se desplaza hacia la degradación de glutamato por la baja afinidad que esta enzima tiene para el amonio (K_m entre 1.5 y 3 mM) (Miller y Stadtman, 1972). La enzima GS tiene una alta afinidad para el amonio ($K_m < 200 \mu\text{M}$) (Denton y Ginsburg, 1970) y su reacción es prácticamente irreversible, por lo que el ciclo GS-GOGAT se encarga de la asimilación de amonio en estas condiciones, aún cuando esta vía es más costosa al consumir una molécula de ATP. Por otro lado, cuando el amonio se encuentra en exceso, la actividad de GDH aumenta considerablemente y la actividad de GOGAT disminuye. (Meers y cols., 1970)

En *Bacillus megaterium*, que carece de actividad de GDH, el ciclo GS-GOGAT parece ser la principal vía (si no es que la única) para la síntesis de glutamato. Tanto en *K. aerogenes* como en *B. megaterium*, la enzima GOGAT se reprime cuando el glutamato es la fuente de nitrógeno (Elmerich y Aubert, 1971). En los

organismos que fijan nitrógeno, la asimilación de amonio ocurre por el ciclo GS-GOGAT (Nagatani y cols., 1971).

La enzima GOGAT de *E. coli* es una flavoproteína fierro-azufre oligomérica, compuesta por dos diferentes tipos de subunidades con un masa molecular de 53 kDa y 153 kDa respectivamente. El protómero, compuesto de una subunidad chica (α) y una grande (β), contiene una molécula de FAD^+ y una de FMN^+ además de ocho fierros y ocho azufres lábiles (Miller y Stadtman, 1972). Cuatro protómeros $\alpha\beta$ se asocian originando una estructura de masa molecular de 800 kDa.

El número reportado de protómeros en la enzima nativa de las diferentes bacterias varía entre uno y cuatro, lo que corresponde a masas moleculares de 200 kDa y 800 kDa respectivamente (ver tabla 1). La enzima GOGAT de *A. brasilense* presenta una masa molecular de 190 kDa en condiciones de alta fuerza iónica (Vanoni y cols., 1990). La enzima de *Bacillus licheniformis* no se asocia bajo las diferentes condiciones probadas, incluyendo variaciones en la fuerza iónica (Schreier y Bernlohr, 1984). Carlberg y Norldung (1991) encontraron dos formas oligoméricas de la enzima GOGAT de *Rhodospirillum rubrum* que dependen de la presencia de iones Cl^- en el amortiguador. En 0.1M de KCl la proteína se asocia como un octámero de 810 kDa, y en ausencia de KCl como un tetrámero de 375 kDa. Estos resultados sugirieron que la forma oligomérica de 800 kDa se debía principalmente a la presencia de iones Cl^- , y que la forma nativa de la GOGAT de *Rsp. rubrum* es el

protómero o posiblemente un dímero de éste protómero. La presencia de iones Cl^- en el amortiguador también afectó los parámetros cinéticos de la enzima, quedando por establecer si tiene un efecto fisiológico *in vivo*.

El NADPH es utilizado como cofactor en las enzimas GOGAT de enterobacterias, bacterias aerobias que fijan nitrógeno, y en bacterias fotosintéticas púrpuras no-sulfurosas. La enzima GOGAT de bacterias sulfurosas púrpuras y verdes, así como la enzima GOGAT de *Clostridium pasteurianum*, una bacteria anaerobia que fija nitrógeno, utilizan al NADH como cofactor (Wang y Nicholas, 1985; Singhal y cols., 1989). La tabla 1 presenta una comparación de los distintos parámetros cinéticos obtenidos para las enzimas GOGAT de estos organismos.

TABLA 1. Comparación de las propiedades de las enzimas GOGAT dependientes de NADPH y de NADH de distintas bacterias

Fuente	Masa molecular (kDa)	subunidades (kDa)	forma oligómerica	pH	Kms (μ M)		
					NADPH	2-oxo	gln
<i>Escherichia coli</i> ^a	800	135 y 53	α 4 β 4	7.6	7.7	7.3	250
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ^b	810 375	152 y 53	α 4 β 4 α 2 β 2	8.0	16	10	65
<i>Klebsiella aerogenes</i> ^c	227	175 y 51.5	α β	7.8	12	300	300
<i>Azospirillum brasilense</i> ^d	185	135 y 50	α β	7.5	6.3	29	450
<i>Bacillus licheniformis</i> ^e	220	158 y 54	α β	7.8	13	6 50	8 100
<i>Thiobacillus thioparus</i> ^f	280	nd y 72	α β	7.3-7.8	3	50	1100
					Kms (μ M)		
					NADH	2-oxo	gln
<i>Dexia gumosa</i> ^g	nd	nd	nd	7.2-8.2	9.6	24	270
<i>Clostridium pasteurianum</i> ^h	590	91, 86, 68 31 y 17.5	decámero	7.2	110	170	160

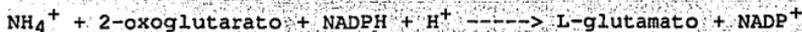
- a Miller y Stadtman, 1972
 b Carlberg y Norlund, 1991
 c Trotta y cols., 1974
 d Ratti y cols., 1985
 e Schreier y cols., 1984
 f Adachi y Suzuki, 1977
 g Wang y Nicholas, 1985
 h Singhal y cols., 1989

nd no determinado

La enzima GOGAT cataliza la siguiente reacción que depende de glutamina (reacción A):



También se ha demostrado que la enzima GOGAT cataliza la síntesis de glutamato dependiente de amonio (reacción B):



Sin embargo, esta actividad representa solamente entre el 5 y 7% de la reacción dependiente de glutamina (reacción A). Aparentemente esta reacción es muy similar a la que cataliza la enzima GDH (Mäntsälä y Zalkin, 1976b).

En la enzima GOGAT de *E. coli*, los grupos fierro-azufre y flavinas se requieren para la síntesis de glutámico dependiente de glutamina (reacción A) (Mäntsälä y Zalkin, 1976b). Los estudios bioquímicos que emplean a la clorocetona, un análogo de glutamina, demostraron que esta sustancia se une a un residuo de cisteína de la subunidad grande, inhibiendo la actividad dependiente de glutamina de esta enzima (reacción A), mientras que la actividad dependiente de amonio (reacción B) permanece inalterada (Trotta y cols., 1974; Mäntsälä y Zalkin, 1976b).

Por estudios de EPR y CD, se demostró la presencia de tres centros fierro-azufre diferentes en *Azospirillum brasilense*

(Vanoni y cols., 1992): un centro $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+,0}$ (centro 1) y un centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+,1+}$ (centro 2), que pueden ser reducidos por el donador fisiológico de electrones NADPH. Un tercer centro Fe-S de bajo potencial (centro 3), presumiblemente también un grupo $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+,1+}$, se detectó durante las mediciones de EPR, aunque su papel en la catálisis no se conoce todavía. Solo el centro 1 $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+,0}$ está presente en la Fd-GOGAT de plantas. En *E. coli* y *A. brasilense* existen dos regiones de unión a grupos $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+,1+}$ en la subunidad β (Pelanda y cols., 1993).

El mecanismo cinético de la reacción dependiente de glutamina (reacción A) ha mostrado ser un mecanismo Uni Uni Bi Bi ping-pong en las enzimas GOGAT de *E. coli* y *A. brasilense* (Rendina y Orme-Johnson, 1978; Vanoni y cols., 1991). El NADPH interactúa con una de las dos flavinas en el primer subsitio activo y los electrones se transfieren a la segunda flavina a través de los centros hierro-azufre. En el segundo sitio toma lugar la reducción del iminoácido, formado a partir del 2-oxoglutarato y el amonio que proviene del grupo amido de la glutamina. Aunque todavía no se sabe cual flavina (FAD^+ o FMN^+) se encuentra en cada subsitio, éstas mostraron que no son equivalentes desde el punto de vista funcional, basándose en su diferente reactividad con sulfito (Vanoni y cols., 1992), el cual interactúa solamente con la flavina que está en el sitio del imino-glutarato formando un aducto N(5)-sulfito.

Distintos reportes han establecido similitudes y diferencias entre la enzima GOGAT y otras enzimas glutamina amidotransferasas (Trotta y cols., 1974; Mäntsälä y Zalkin, 1976a; Mäntsälä y Zalkin, 1976b; Geary y Meister, 1977). Al igual que estas enzimas, GOGAT presenta actividad de glutaminasa, y puede utilizar amonio en lugar de glutamina para la síntesis de ácido glutámico (reacción B). Las principales diferencias son la presencia de los grupos fierro-azufre y flavinas, y la unión de la glutamina a la subunidad grande en GOGAT.

Gosset y cols. (1989) buscaron similitudes entre las secuencias de la enzima GOGAT de *E. coli* y enzimas amidotransferasas dependientes de glutamina, y con enzimas que unen dinucleótidos. Estos autores encontraron regiones conservadas con gran similitud entre la secuencia amino terminal de la subunidad grande de *E. coli* y la enzima glutamina fosforribosilamina : pirofosfato fosforribosiltransferasa de *E. coli* y de *Bacillus subtilis*. En esta última enzima, la región N-terminal ha mostrado ser parte del sitio de unión a glutamina a través de un residuo esencial de cisteína (dominio glutamina amidotransferasa de enzimas amidotransferasas del tipo *purF*), lo que sugiere un papel similar para la región correspondiente en la subunidad grande de la GOGAT de *E. coli*. Este residuo de cisteína, en la enzima GOGAT de *E. coli* está involucrado en la liberación del grupo amido de la glutamina (Gosset y cols., 1989; Mei y Zalkin, 1989; Mei y Zalkin, 1990). Esta conclusión puede ser extendida a la enzima GOGAT de *Azospirillum* y Fd-GOGAT de

maíz, basándose en la alta similitud que presentan con la región N-terminal de la subunidad grande de *E. coli*, y en la presencia del residuo conservado de cisteína en la posición uno (Mei y Zalkin, 1989; Mei y Zalkin, 1990; Vanoni y cols., 1990; Pelanda y cols., 1993). Después de la síntesis de la subunidad grande de la enzima GOGAT de *E. coli*, ocurre una proteólisis del amino terminal, y el residuo de cisteína queda en la posición uno de la cadena polipeptídica (Gosset y cols., 1989). Este evento ocurre también en las enzimas GOGAT de plantas (Sakakibara y cols., 1991; Gregerson y cols. 1993)

Existe en la subunidad grande de la GOGAT de *E. coli* otro sitio de unión a glutamina que presenta también un residuo conservado de cisteína y es similar al dominio de glutamina amidotransferasa de enzimas aminotransferasas tipo *trpG* (Gosset y cols., 1989; Mei y Zalkin, 1989; Mei y Zalkin, 1990). Este segundo sitio no se encuentra en la GOGAT de *A. brasilense* ni en la Fd-GOGAT de maíz (Pelanda y cols., 1993). Gosset y cols. (1989) han sugerido que este sitio podría estar involucrado en la modulación alostérica por glutamina.

Gosset y cols. (1989) identificaron dos posibles sitios de unión a dinucleótidos en la subunidad chica de la enzima GOGAT de *E. coli*, por la presencia de una secuencia altamente similar al sitio de unión a dinucleótidos de varias enzimas, y por predicciones de estructura secundaria (presencia del componente α - β - α del dominio de unión a dinucleótidos). Uno de estos

segmentos muestra mayor similitud con los dominios de unión a dinucleótidos, por lo que es la región más probable de unión al NADPH. Rendina y Orme-Johnson (1978) encontraron activación *in vitro* de la enzima GOGAT por el NADP⁺ a bajos niveles de 2-oxoglutarato. Esta activación resulta al bajar el valor de Km para el 2-oxoglutarato y podría involucrar la unión del NADP⁺ a un sitio diferente al sitio de unión al NADPH. Entonces, el sitio de unión a dinucleótidos que se encuentra menos conservado en la subunidad pequeña de GOGAT podría jugar un papel importante en la modulación de la actividad de la enzima (Pelanda y cols., 1993).

Basados en la localización de las regiones de unión a los cofactores y a los sustratos (Fig. 1), y al requerimiento de la distribución de electrones entre los grupos en ambas subunidades durante la catálisis (Vanoni y cols., 1992), se puede proponer que el sitio activo de la enzima se encuentra en la interfase entre las subunidades α y β (Pelanda y cols., 1993).

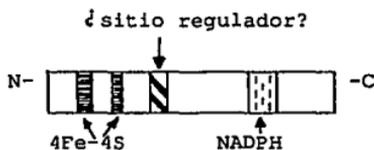
Subunidad α Subunidad β 

Fig. 1. Identificación tentativa de los dominios funcionales en la enzima GOGAT de *A. brasilense* (Pelanda y cols., 1993). Subunidad α : GAT, dominio tipo purF de enzimas glutamina amidotransferasas (residuos 1-350); FMN⁺, región de unión a FMN⁺ (residuos 1000-1100); 3Fe-4S, residuos de cisteína que unen al grupo [3Fe-4S]₁₊₀ (residuos 1102-1114); FAD⁺, regiones de unión a FAD⁺ (residuos 1281-1291 y 1354-1396). Los asteriscos señalan regiones conservadas cuya función no se ha identificado (residuos 470-530, 695-750, y 880-1000). Subunidad β : 4Fe-4S, regiones ricas en cisteínas para la unión de los dos grupos [4Fe-4S]₂₊₁ (residuos 47-59 y 94-108); NADPH, región de unión a NADPH (residuos 289-339); sitio regulador, posible sitio de unión para un modulador alostérico (se propone al NADP⁺) (residuos 149-177).

Singhal y cols. (1989), reportaron la purificación de la enzima GOGAT de *Clostridium pasteurianum*, una bacteria anaeróbica que fija nitrógeno. Esta enzima, a diferencia de las anteriormente mencionadas, tiene cinco subunidades distintas de 91, 86, 68, 31 y 17.5 kDa y una masa molecular en su estado nativo de 590 kDa. La suma de las masas moleculares propone la existencia de un decámero formado por dímeros de cada subunidad.

3. Enzima Glutamato Sintasa de cianobacterias

La enzima GOGAT dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) se describió inicialmente en *Nostoc* y *Anabaena*, y posteriormente en *Anabaena cylindrica* y en heterocistos de *Anabaena* sp. PCC7122, *A. variabilis* y *N. muscorum* (Marquès y cols., 1992).

La enzima Fd-GOGAT de *Synechococcus* sp. PCC 6301 ha sido recientemente caracterizada (Marquès y cols., 1992). Esta enzima es un monómero de 156 kDa, y presenta una molécula de FMN⁺ pero no de FAD⁺. Los valores de Km se presentan en la Tabla 2 comparados con los valores para las enzimas Fd-GOGAT de plantas. Esta proteína es la primera Fd-GOGAT que se ha purificado de un organismo procarionte, por lo que se ha sugerido que la enzima Fd-GOGAT de cianobacterias podría ser el antecesor de la enzima Fd-GOGAT de plantas.

4. Enzima Glutamato Sintasa de plantas

El ciclo GS-GOGAT constituye la principal vía de asimilación de amonio en las plantas (Robertson y cols., 1975; Mifflin y Lea, 1977). Se han purificado dos proteínas con actividad de GOGAT, que se distinguen en el cofactor que utilizan, cinética, masa molecular y localización dentro de la planta (ver Tabla 2).

Las enzimas Fd-GOGATs tienen una masa molecular entre 130 y 180 kDa, se encuentran localizadas predominantemente en cloroplastos y se encargan de asimilar el amonio producto de la reducción de nitratos dependiente de la luz y el que proviene de la fotorrespiración (Suzuki y Gadal, 1984; Kendall y cols., 1986). Las enzimas Fd-GOGAT se purificaron a homogeneidad de hojas verdes de espinaca (Suzuki y cols., 1982), tomate (Avila y cols., 1987), maíz (Sakakibara y cols., 1991) y del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Galván y cols., 1984). Las enzimas Fd-GOGAT contienen FAD^+ , FMN^+ y un centro Fe-S, que ha sido caracterizado en la Fd-GOGAT de espinaca como un [3Fe-4S] (Knaff y cols., 1991). El cDNA que codifica para la enzima Fd-GOGAT de maíz se clonó y secuenció, con lo que se obtuvo la estructura primaria de la proteína. Esta enzima presenta un alto grado de similitud con la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Sakakibara y cols., 1991; Gregerson y cols., 1993) (Ver Fig. 2).

TABLA 2: Comparación de las propiedades de las enzimas GOGAT dependientes de ferredoxina de distintas plantas y cianobacterias.

Fuente	Masa molecular (kDa)	subunidades	pH	Kms (µM)		
				Fd	2-oxo	gln
<i>Synechococcus</i> sp PCC 6301 ^a	156	1	7.5	7.1	1700	700
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^b	146	1	7.5	15	1000	700
<i>Zea mays</i> ^c	160	1	6.9	1.7	240	1100
<i>Spinacea oleracea</i> ^d	170	1	7.5-8.5	1	90	560
<i>Lycopersicon esculentum</i> ^e	141	1	7.8	0.2	200	550
<i>Oryza sativa</i> ^f	224	2	7.3	5.5	330	270-570

^a Marqués y cols., 1992

^b Hirasawa y cols., 1991

^c Stookey, 1970

^d Hirasawa y Tamura, 1984; Knaff y cols., 1991

^e Avila y cols., 1987

^f Suzuki y Gadal, 1982

La enzima GOGAT dependiente de NADH es una flavoproteína que se localiza en tejidos no-verdes. Esta enzima se ha reportado en raíces (Suzuki y Gadal, 1984; Kendall y cols., 1986), brotes (Matho y cols., 1980; Tamura y cols., 1980; Suzuki y cols., 1982), nódulos (Boland, 1978; Groat y Vance, 1981; Chen y Cullimore, 1988; Anderson y cols., 1989), y en células en cultivo

(Hayakawa y cols., 1992). La enzima de raíz y nódulo es altamente inestable y se sintetiza en poca cantidad. En los nódulos de alfalfa y de lupino (altramuz), la actividad de GOGAT está asociada a una sola forma de la enzima, que tiene un valor de masa molecular en estado nativo de 225 kDa y una masa molecular de la subunidad de 200 kDa (Benny y Boland, 1977; Anderson y cols., 1989). En contraste, la enzima NADH-GOGAT de nódulos de frijol se presenta como dos isoformas (I y II), cada una con una masa molecular de 200 kDa (Chen y Cullimore, 1988). La actividad de la enzima NADH-GOGAT aumenta durante el desarrollo de los nódulos y tiene como función asimilar el amonio proveniente de la fijación bacteriana, por lo que se le ha identificado como una nodulina (Gregerson y cols., 1993).

La enzima NADH-GOGAT de alfalfa se procesa proteolíticamente a su forma madura. El alineamiento de las secuencias de las enzimas NADH-GOGAT de alfalfa, Fd-GOGAT de maíz y NADPH-GOGAT de *E. coli* (Fig. 2) revela que la proteína de alfalfa, a diferencia de la de maíz, contiene secuencias que corresponden a la subunidad α y a la subunidad β de la enzima NADPH-GOGAT de procariontes. La enzima NADH-GOGAT de alfalfa presenta una secuencia hidrofílica de aproximadamente 60 aminoácidos, y contiene un gran número de aminoácidos cargados. Esta secuencia parece unir a la región que corresponde al carboxilo terminal de la subunidad α y a la región que corresponde al amino terminal de la subunidad β . Las secuencias de aminoácidos de la subunidad α

de *E. coli* y Fd-GOGAT de maiz son similares a la GOGAT de alfalfa en un 46 y un 48% respectivamente. La subunidad β es menos similar (38%) a la proteína de alfalfa. Las enzimas GOGAT de alfalfa y maiz, así como la subunidad α de *E. coli*, se traducen como preproteínas. La secuencia de aminoácidos de la NADH-GOGAT de alfalfa en su porción similar a la subunidad α de la GOGAT de *E. coli* presenta un sitio de unión a FMN⁺ y tres cisteínas involucradas en la unión al grupo [3Fe-4S]. En la región que corresponde a la subunidad β de la GOGAT de *E. coli* existe un sitio de unión a NADH. (Gregerson y cols., 1993)

Tabla 3. Comparación de las propiedades de las enzimas GOGAT dependientes de NADH purificadas a partir de distintas plantas.

Fuente	Masa molecular (kDa)	subunidades	pH	Kms (μ M)		
				NADH	2-oxo	gln
<i>Medicago sativa</i> ^a	200	1	7.5-8.0	4.2	33	466
<i>Phaseolus vulgaris</i> ^b	I	200	8.0	14	22	770
	II	200	8.5	5.2	87	240
<i>Oryza sativa</i> ^c	196	1	nd	3.0	76	811

^a Anderson y cols., 1989

^b Chen y Cullimore, 1988

^c Hayakawa y cols., 1992

nd no determinado

NADH-GOGAT de Alfalfa



Fd-GOGAT de Maíz

NADPH-GOGAT de *E. coli*

Fig. 2. Comparación esquemática de proteínas GOGAT de distintos organismos. La numeración de los aminoácidos comienza con la metionina que da inicio a cada polipéptido. Las regiones que están sombreadas de la misma manera indican regiones con similitud de secuencia. Las cajas al inicio de la proteína indican las presecuencias de los precursores enzimáticos. La porción oscura de la proteína de alfalfa señala la secuencia de aminoácidos que une las regiones que son similares a las subunidades α y β de la enzima GOGAT de *E. coli*. Obtenido de Gregerson y cols., 1993.

5. Enzima Glutamato Sintasa de hongos

La importancia relativa de la vía GDH o de la vía GS-GOGAT en la asimilación de amonio en hongos no está bien establecida. Por un lado, se ha encontrado que la vía GS-GOGAT se utiliza en los hongos *Aspergillus nidulans* (Kusnan y cols., 1987), *Neurospora crassa* (Hummelt y Mora, 1980; Lomnitz y cols., 1987) y *Schizosaccharomyces pombe* (Barel y MacDonald, 1993) cuando el amonio se encuentra en concentraciones limitantes. Los trabajos de Holmes y cols. (1989) también han demostrado que el ciclo GS-GOGAT es la principal vía de asimilación de amonio en varias especies patógenicas de *Candida* spp (*C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* y *C. parapsilosis*). Sin embargo, este ciclo se ha considerado poco importante para la asimilación de amonio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Bogonez y cols., 1985), *Candida utilis* (Zwart y Harder, 1983) y *Candida boidinii* (Green y Large, 1984), donde la principal vía de asimilación tanto en exceso como en limitación de amonio es la enzima GDH-NADP⁺. La dificultad para obtener mutantes en la actividad de GOGAT en *S. cerevisiae* no ha permitido conocer el papel fisiológico y la regulación de GOGAT en esta levadura.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad de GOGAT se detectó y semipurificó por primera vez por Roon y cols. (1974). Masters y Meister (1982) purificaron a homogeneidad la enzima, reportando que es un dímero de 265 kDa que comprende una subunidad grande de

169 KDa y una subunidad chica de 61 KDa. A diferencia de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*, la enzima GOGAT de *Neurospora crassa* es un monómero de 200 kDa (Hummelt y Mora, 1980). La tabla 3 muestra algunas características de estas enzimas.

Tabla 3. Comparación de las propiedades de las enzimas GOGAT dependientes de NADH purificadas a partir de distintos hongos.

Fuente	Masa molecular (kDa)	subunidades	pH	Kms (μ M)		
				NADH	2-oxo	gln
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^a	nd	nd	7.1-7.7	2.6	140	1000
<i>S. cerevisiae</i> ^b	265	169 y 61	7.0-7.5	7	40	280
<i>Neurospora crassa</i> ^c	200	1	nd	nd	nd	nd

^a Roon y cols., 1974 (datos obtenidos de una semipurificación)

^b Masters y Meister, 1982 (datos obtenidos de una preparación homogénea)

^c Hummelt y Mora, 1980

6. Antecedentes

En nuestro laboratorio se obtuvo una cepa de *S. cerevisiae* con auxotrofia por glutámico a partir de una cepa carente de actividad de GDH-NADP⁺ (*gdh*⁻). Este auxótrofo de glutámico (CN33) no presenta actividad de GOGAT y el análisis genético mostró que el fenotipo *gogat*⁻ está conferido por una doble mutación (*gus1*, *gus2*) (Folch y cols, 1989). A partir de la cepa (CN33) se efectuaron cruza para obtener cepas con una sola mutación.

Se analizó la progenie de la cruzada realizada con la cepa CN33 y se obtuvieron los siguiente resultados: la cepa CN36 presenta dos picos de actividad óptimos a diferentes valores de pH (6.5 y 7.0) (Fig. 3A); las cepas CN37 y CN38 mostraron un solo pico de actividad de GOGAT, GOGAT A (pH 6.5) y GOGAT B (pH 7.0) respectivamente (Fig. 3B), y la cepa CN39 presentó las dos mutaciones que originan bajos niveles de actividad de GOGAT independientemente del valor de pH empleado (Fig 3B).

Los extractos obtenidos a partir de la cepa silvestre S288C (GOGAT⁺GDH⁺) (Fig. 3A) muestran solamente la actividad de GOGAT B. La cepa silvestre acumula glutamato en mayor cantidad que las cepas mutantes *gdh*⁻ por lo que, esta mayor concentración podría estar modulando negativamente la expresión de la actividad de GOGAT A en la cepa silvestre. Un dato que apoya esta hipótesis es que la adición de glutámico a un cultivo de la cepa CN36, crecido

en medio mínimo, da como resultado una disminución en la actividad de GOGAT A (Fig 3C). (Folch y cols., 1989).

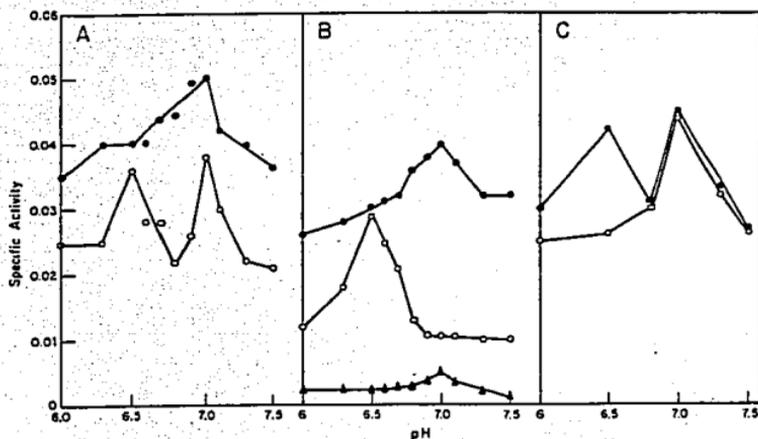


Fig. 3. Actividad de la enzima GOGAT de levadura a diferentes valores de pH. Las células se incubaron en medio MM con 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lisina al 0.01% e histidina al 0.01% (como requerimientos auxotróficos) durante 12 horas. A. Cepa S288C (●), y CN36 (○). B. Cepas CN37 (●), CN38 (○), y CN39 (▲). C. La cepa CN36 se creció con (○) o sin (●) glutamato. Obtenido de Folch y cols., 1989).

Tomando en cuenta que se requieren dos mutaciones para obtener cepas de *S. cerevisiae* carentes de actividad de GOGAT, y la presencia de dos picos de actividad de GOGAT en función del pH, se pensó en la existencia de dos enzimas diferentes con

actividad de GOGAT en *S. cerevisiae*. Es posible que en la levadura para panificación usada por Masters y Meister (1982), la síntesis de GOGAT A (pH 6.5) estuviera reprimida por la alta poza de glutamato acumulada como resultado de la actividad de GDH dependiente de NADP+, por esta razón se ha sugerido purificar la actividad de GOGAT A a partir de una cepa *gdh*⁻.

II. OBJETIVOS

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, los objetivos planteados en el presente trabajo son:

1. Determinar si *S. cerevisiae* presenta dos proteínas con actividad de GOGAT, mediante la purificación de la enzima GOGAT a partir de una cepa gdh^- (CN36).
2. Caracterización bioquímica de la enzima GOGAT de levadura de la cepa CN36.
3. Secuenciación del amino terminal de la enzima purificada y comparación de esta secuencia con las reportadas para enzimas GOGAT de otros organismos.
4. Obtención de anticuerpos contra la enzima GOGAT de levadura y estudios de reacción cruzada con la enzima GOGAT de levadura para panificación y la enzima GOGAT de otros organismos.

III. MATERIALES Y METODOS

Condiciones de crecimiento

La cepa CN36 de *S. cerevisiae* (Folch y cols., 1989) se creció en un fermentador con capacidad de 15 litros. Se inocularon 10 litros de medio mínimo (MM) que contiene sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de la base nitrogenada para levadura (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan), así como glucosa al 2% y sulfato de amonio 40 mM. Se adicionó histidina y lisina al 0.01% (peso/vol) como requerimientos auxotróficos. Los cultivos fueron incubados en agitación (300 rpm) a 30°C, y aerados con 7 litros de oxígeno por minuto. Las células se colectaron a una densidad óptica de 2.0 a 600 nm y se almacenaron a -70°C.

La cepa de *E. coli* MX614 se creció en medio mínimo a 37°C y 250 rpm, en matraces de 3 litros de capacidad. Las células se colectaron en la fase exponencial tardía del crecimiento y se almacenaron a -70°C.

Purificación de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*.

La GOGAT de *S. cerevisiae* se purificó por medio del siguiente procedimiento; todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. En el apéndice se resumen las características de las columnas de cromatografía.

Paso 1: extracto crudo. Las células se descongelaron y resuspendieron en 1 ml de amortiguador de extracción [fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.5), EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y TLCK 50 µl/ml] por gramo de células. Los extractos crudos se obtuvieron después de romper mecánicamente las células con un Bead-Beater (Biospec Products) (diez ciclos de un minuto). Después de centrifugar a 35 000 x g durante 30 minutos, el extracto de proteína se diluyó a 30 mg/ml con amortiguador de extracción.

Paso 2: Precipitación con sulfato de amonio. La precipitación con sulfato de amonio se llevó a cabo como lo describen Sakamoto y cols. (1975). Las proteínas que precipitan entre 30-53% de sulfato de amonio se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de potasio (pH 7.5), EDTA 1 mM, 2-oxoglutarato 2 mM, DTT 1 mM, y PMSF 1 mM (amortiguador A) a una concentración de 60 mg/ml. La mezcla se dializó contra 8 litros de amortiguador A sin 2-oxoglutarato ni DTT (amortiguador B).

Paso 3: Cromatografía con DEAE-BioGel A. La fracción dializada se cargó a una columna de DEAE-BioGel A (23 x 2.8 cm) equilibrada con amortiguador A. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 4 volúmenes de columna de amortiguador A. Inmediatamente después la enzima GOGAT se eluyó con un gradiente de KCl (0-0.5 M) (10 volúmenes de columna). Las fracciones con actividad de GOGAT se juntaron y se dializaron contra amortiguador B.

Paso 4: Cromatografía con fenil-Sefarosa. La fracción obtenida en el paso anterior se llevó al 12% de saturación de sulfato de amonio. Esta muestra se aplicó a una columna de fenil-Sefarosa (23 x 1.7 cm) equilibrada con amortiguador A al 12% de saturación con sulfato de amonio en ausencia de PMSF. La columna se lavó con este mismo amortiguador, y se eluyó con un gradiente lineal inverso de 12 a 0% de saturación de sulfato de amonio y con un gradiente simultáneo de etilenglicol del 0 al 5% en amortiguador A. La actividad de GOGAT se eluyó posteriormente con un gradiente lineal de etilenglicol (0 a 40%) en el mismo amortiguador.

Paso 5: Cromatografía con DEAE-Sefarosa. Las fracciones que exhibieron actividad se juntaron y colocaron en una columna de DEAE-Sefarosa (23 x 1.7 cm) previamente equilibrada con amortiguador A. La elución de la muestra se llevó a cabo como se describe en el paso 3. Las fracciones con actividad de GOGAT se juntaron y se dializaron contra amortiguador B.

Paso 6: Cromatografía de afinidad. Una columna de Sefarosa azul (13 x 1.2 cm) se equilibró con fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.5), EDTA 1 mM, 2-oxoglutarato 0.2 mM, glicerol 5%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y TLCK 50 μ l/ml (amortiguador C). Después de aplicar la muestra que se obtuvo del paso 5, la columna se lavó con 20 volúmenes de columna de amortiguador C. La actividad de GOGAT se eluyó con amortiguador C conteniendo 0.1 mM de NADH. La fracción con mayor actividad de GOGAT se dializó contra amortiguador B, se

concentró por ultrafiltración con un filtro Amicon YM 30 y se guardó a -70°C .

Purificación de la enzima GOGAT de *E. coli*.

La NADPH-GOGAT de *E. coli* se purificó para obtener anticuerpos contra cada una de sus subunidades y efectuar estudios de inmunorrélicas tipo western. También se utilizó en la obtención del peso molecular nativo de la GOGAT de levadura. Para purificar la enzima se empleó el método de Sakamoto y cols. (1975) con algunas modificaciones; todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C .

Paso 1: Extracto crudo. Las células de *E. coli* se resuspendieron (3 ml/g de células) en fosfato de potasio 10 mM (pH 7.2), EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1mM y TLCK 50 $\mu\text{l/ml}$, y se rompieron con un Sonicador Branson a 5 watts por dos períodos de 3 min cada uno. Los desechos celulares se removieron por centrifugación a $35\ 000 \times g$ durante 30 min.

Paso 2: Precipitación con sulfato de estreptomycin. Este paso se llevó a cabo como lo describen Sakamoto y cols. (1975). El sobrenadante se dializó toda la noche contra 9 litros de fosfato de potasio 10 mM (pH 7.2), EDTA 1mM y DTT 1 mM.

Paso 3: Precipitación con sulfato de amonio 32.5-53%. La precipitación con sulfato de amonio se llevó a cabo como lo describen Sakamoto y cols. (1975). Las proteínas que precipitan

entre 32.5 y 53% se disolvieron en fosfato de potasio 20 mM (pH 7.2), EDTA 1 mM, 2-oxoglutarato 2mM, KCl 100 mM y DTT 1 mM (amortiguador D) a una concentración de 60 mg/ml, y se dializaron toda la noche contra el mismo amortiguador sin 2-oxoglutarato ni DTT (amortiguador E).

Paso 4: Cromatografía con DEAE-BioGel A. La fracción dializada se colocó en una columna de DEAE-BioGel A (23 x 2.8 cm) equilibrada con amortiguador D. La columna se lavó con el mismo amortiguador y se eluyó inmediatamente después con un gradiente lineal de KCl de 0.1 a 0.7 M en amortiguador D. Las fracciones con mayor actividad de GOGAT se juntaron y se dializaron toda la noche contra amortiguador E.

Paso 5: Cromatografía con DEAE-Sefarosa. El dializado del paso anterior se pasó por una columna de DEAE-Sefarosa (23 x 1.7 cm) equilibrada con amortiguador D. Las proteínas se eluyeron como en el paso 4 y se dializaron toda la noche en amortiguador E.

Paso 6: Cromatografía de afinidad. Una columna de agarosa roja (13 x 1.2 cm) se equilibró con amortiguador D. Después de poner la muestra, la columna se lavó exhaustivamente con 20 volúmenes de amortiguador D. La actividad de GOGAT se eluyó con amortiguador D que contenía NADPH 0.1 mM. Las fracciones con actividad se juntaron y se dializaron contra fosfato de potasio 20 mM (pH 7.2), EDTA 1mM y 2-oxoglutarato 2 mM. El dializado se concentró con una membrana Amicon YM 30 y se guardó a -70°C.

Determinación de proteína

La cantidad de proteína se midió por el método de Lowry y cols., (1951). Se usó albúmina de suero bovino para obtener la curva patrón.

Ensayos de actividad

La actividad de GOGAT de levadura se determinó por el método descrito por Roon y cols., (1974) [2-oxoglutarato 5 mM, glutamina 5 mM, NADH 0.16 mM en fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.0)]. Como control de la actividad de GOGAT se utilizó azaserina (5mM), que es un inhibidor de amidotransferasas (Hummelt y Mora, 1980). Todos los ensayos se llevaron a cabo a pH 7.0.

La actividad de la enzima GOGAT de *E. coli* se determinó por el método de Meers y cols. (1970), y se incluyeron controles en presencia de azaserina.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se llevó a cabo como lo describen Schägger y cols. (1986), usando peines de 1.2 mm de grosor; los geles se fijaron y se tiñeron con azul de Coomasie.

Determinación de la masa molecular.

La masa molecular de las proteínas nativas se determinó por medio de una columna de filtración en gel Sefacril S-300 (2.6 x 90 cm) equilibrada con fosfato de potasio 50 mM (pH 7.5), NaCl

150 mM y DTT 1 mM (amortiguador F) y se eluyó a una velocidad de 6 ml/hr. La columna se calibró con marcadores de masa molecular de Sigma Chemical Co. (tiroglobulina, 669 kDa; apoferritina, 443 kDa; b-amilasa, 200 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa; albúmina bovina, 66 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa) disueltos en amortiguador F más glicerol al 5%. La masa molecular se determinó graficando el log de la masa molecular de los marcadores contra V_e/V_o .

La masa molecular aparente de las subunidades se determinó por SDS-PAGE (Schägger y cols., 1986) usando marcadores de masa molecular de Sigma Chemical Co. (miosina, 205 kDa; b-galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa B, 97.4 kDa; albumina bovina, 66 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa; y anhidrasa carbónica, 29 kDa).

Cinética enzimática

Los estudios cinéticos de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae* se realizaron con la proteína obtenida después de la cromatografía de afinidad (paso 6). Esta enzima se había almacenado a -70°C en amortiguador B. Los valores de K_m se obtuvieron midiendo la actividad de GOGAT a diferentes concentraciones de glutamina, 2-oxoglutarato o NADH y concentraciones saturantes de los otros substratos. El 2-oxoglutarato y la glutamina se usaron en concentraciones de 0 a 0.5 mM y 0 a 5 mM respectivamente. La K_m para el NADH se

determinó usando reacciones de curso temporal, a concentraciones iniciales de NADH de 25, 50 y 100 μ M.

El pH óptimo de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae* se determinó con el mismo amortiguador de ensayo ajustado a los diferentes valores de pH con una solución de KOH. El efecto de los inhibidores se probó a concentraciones que excedían en 5 y 10 veces la concentración de 2-oxoglutarato; todos los sustratos se usaron a concentraciones saturantes (2-oxoglutarato 1 mM, glutamina 5 mM y NADH 0.16 mM). El análisis de inhibición se efectuó también con concentraciones de 50 a 100 veces la concentración de 2-oxoglutarato (0.1 mM).

Producción de anticuerpos.

Los anticuerpos contra las subunidades de las enzimas GOGAT de *S. cerevisiae* y de *E. coli* se obtuvieron en conejos y se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato de amonio de acuerdo al método descrito por González-Halphen y cols. (1991).

Procedimiento para inmunorrélicas tipo Western

Después de transferir las proteínas de geles de SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa, se llevó a cabo el análisis con anticuerpos como lo describen González-Halphen y cols. (1988).

Análisis de la secuencia del amino terminal

La proteína pura se corrió en geles según Schägger y cols. (1986) y se transfirió a una membrana ProBlott a 250 mA por 18 horas (4°C) en presencia de amortiguador CAPS 10 mM (pH 11.0) y metanol al 10% siguiendo el procedimiento de Matsudaira (1987). Las membranas se tiñeron, destiñeron y se secaron al aire como lo describe el mismo autor. El análisis de la secuencia del amino terminal se llevó a cabo en un Microsecuenciador Modelo 470 con análisis en línea PTH (Applied Biosystems, Inc.) en el Foundation Biotechnology Resource Laboratory de la Fundación W. M. Keck, en la Universidad de Yale.

La búsqueda de similitud de secuencias de aminoácidos y nucleótidos se llevó a cabo en el National Center for Biotechnology Information usando el servicio BLAST network.

IV. RESULTADOS

Purificación de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*

La enzima GOGAT se purificó a partir de extractos crudos de la cepa CN36 (Folch y cols., 1989). Esta cepa tiene una mutación monogénica (gdh^-) que anula la actividad de GDH dependiente de NADPH. Las células se crecieron a una D.O. de 2.0 a 600 nm y los extractos se prepararon como se explica en la sección de materiales y métodos. El extracto crudo mostró una actividad específica de 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína. La primera columna de intercambio aniónico dió un aumento en la actividad específica de 8 veces (tabla I). Aunque las fracciones obtenidas de la columna hidrofóbica de fenil-Sefarosa mostraron una actividad específica mayor, fue necesario utilizar una segunda columna de intercambio iónico para obtener la proteína pura. Después de la cromatografía de afinidad la actividad específica fue de 14.3 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. El incremento de 357 veces la actividad inicial sugiere que la GOGAT debe constituir no más del 0.28% de la proteína total soluble de la célula. Otros experimentos mostraron que el rendimiento final se puede incrementar hasta 9% cuando la fracción de sulfato de amonio (paso 2) se dializa exhaustivamente antes de aplicarla en la columna de DEAE-BioGel A.

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en cada paso del protocolo de purificación se muestran en la Fig. 4. La

preparación final muestra a la proteína pura con una sola banda de 199 kDa.

TABLA I

Purificación de la enzima NADH-GOGAT de *Saccharomyces cerevisiae*^a

Paso de purificación	Proteína total	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento	Factor de Purificación ^b	
	mg	$\mu\text{mol}/\text{min}$	$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$	%	incremento	
Extracto crudo	2928	110	0.04	100	1	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-53%	857	64	0.07	58	2	
DEAE Bio-Gel A	67	22	0.33	20	8	
fenil Sefarosa	9	9	1.00	8	25	
DEAE-Sefarosa	1	4	4.00	4	100	
Sefarosa azul	0.07	1	14.29	1	357	

^a Basado en 49 g de células (peso fresco). Los datos son representativos de cuatro purificaciones separadas.

^b El incremento en actividad específica.

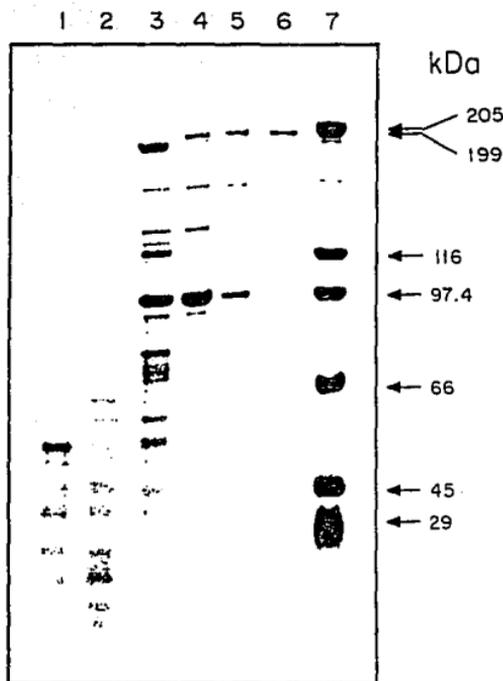


Fig. 4. 6% SDS-PAGE de las principales fracciones obtenidas durante la purificación de la GOGAT de *S. cerevisiae*. Carril 1, extracto crudo (30 μ g); carril 2, precipitado obtenido con sulfato de amonio (30-53%) (30 μ g); carril 3, fracción de DEAE-BioGelA (30 μ g); carril 4, fracción de Fenil Sefarosa (15 μ g); carril 5, fracción de DEAE-Sefarose (4 μ g); carril 6, fracción de Sefarosa Azul (2.5 μ g); carril 7, marcadores de masa molecular (miosina, 200 kDa; β -galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa b, 97 kDa; albumina de suero bovino, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; and anhidrasa carbonica, 29 kDa). Las proteínas se tiñeron con azul de Coomasie.

Purificación de la enzima GOGAT de *E. coli*

Con el procedimiento usado para purificar la GOGAT de *E. coli* cepa MX614 se incrementó en 160 veces la actividad específica (60.9 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) (Tabla II). En la Fig 5 se muestra un gel de SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en cada paso de la purificación. La proteína pura está formada por dos subunidades con una masa molecular aproximada de 150.5 kDa y 50.3 kDa.

TABLE II

Purificación de la enzima NADPH-GOGAT de *E. coli*^a

Paso de purificación	Proteína total	Actividad total	Actividad específica	Rendimiento	Factor de Purificación ^b
	mg	$\mu\text{mol}/\text{min}$	$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$	%	incremento
Extracto crudo	3716	1415	0.38	100	1.0
Sulfato de estreptomicina	2776	1508	0.54	107	1.4
(NH_4) ₂ SO ₄ 32.5-53%	756	958	1.27	68	3.3
DEAE Bio-Gel A	109	369	3.39	26	8.9
DEAE-Sefarosa	14	192	13.71	14	36.1
Agarosa roja	0.46	28	60.87	2	160.2

^a Basado en 45 g de células (peso fresco). Los datos son representativos de tres purificaciones separadas.

^b El incremento en la actividad específica.

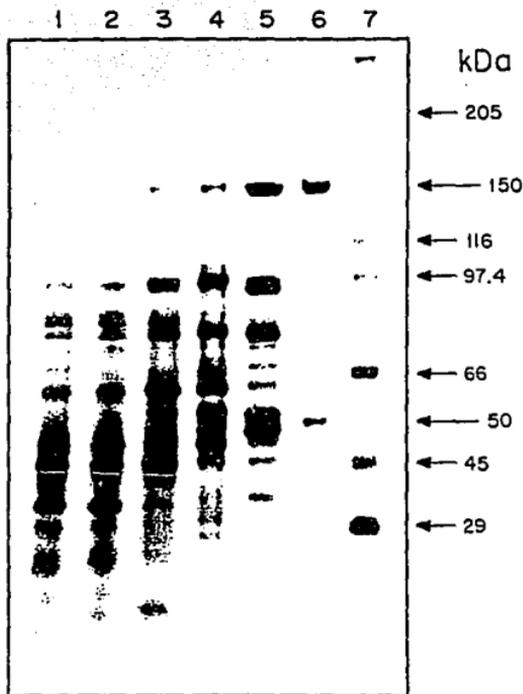


Fig. 5. Análisis en 6% SDS-PAGE durante la purificación de la NADPH-GOGAT de *E. coli*. Carril 1, extracto crudo (30 μ g); carril 2, precipitación con sulfato de estreptomicina (30 μ g); carril 3, fracción 32.5-53% de sulfato de amonio (30 μ g); carril 4, DEAE-BioGela (30 μ g); carril 5, DEAE-Sefarose (30 μ g); carril 6, Agarose roja (5 μ g); carril 7, marcadores de masa molecular (igual que en Fig. 1). Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie.

Masa molecular de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*

La masa molecular de la subunidad de la GOGAT de *S. cerevisiae*, calculado por SDS-PAGE, fue de 199 kDa (Fig 6A). Este valor es similar al de la enzima NADH-GOGAT purificada a partir de nódulos de raíz de alfalfa (Anderson y cols., 1989), lupino (Benny y Boland, 1977), frijol (Chen y cols., 1988) y a la de cultivos celulares de arroz (Hayakawa y cols., 1992).

La masa molecular de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae* nativa calculado por filtración en gel fue de 609.5 kDa (Fig 6B), este valor sugiere que la proteína se asocia como un trímero; por el mismo procedimiento, la masa molecular de la enzima GOGAT de *E. coli* nativa (Fig 6B), dió un valor de 860.2 kDa que corresponde al valor estimado por la secuencia de los genes en un arreglo de cuatro dímeros (874 kDa) (Oliver y cols., 1987).

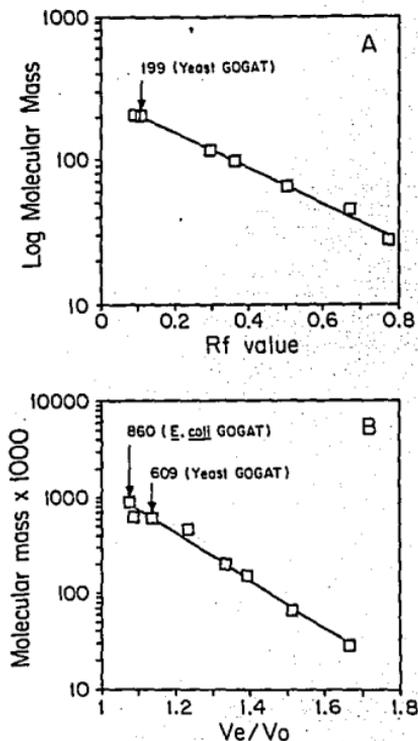


Fig. 6. Masa molecular de las subunidades y de la forma nativa de las enzimas GOGAT de *S. cerevisiae* y *E. coli*. A, Se determinó una masa molecular de 199 + 2.3 kDa para la subunidad de la GOGAT de *S. cerevisiae* por un análisis de regresión lineal ($R^2=0.995$) usando como estándares: miosina 200 kDa; β -galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa b, 97 kDa; albumina de suero bovino, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; y anhidrasa carbónica, 29 kDa. B, Se determinó una masa molecular nativa de 609.5 kDa para la GOGAT de *S. cerevisiae* y de 860.2 kDa para la GOGAT de *E. coli* por análisis de regresión lineal ($R^2=0.989$) de los perfiles de elución de los estándares de proteínas de una columna de filtración en gel Sefacril S-300 gel (estándares: tiroglobulina, 669 kDa; apoferritina, 443 kDa; α -amilasa, 200 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa; albumina bovina, 66 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa).

Región amino terminal de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*

Las preparaciones de GOGAT recuperadas de la columna de afinidad exhibieron una sola banda de 199 kDa. Esta banda de 199 kDa se transfirió a una membrana ProBlott y se determinó la secuencia del extremo amino terminal. El primer residuo no dió señal en el análisis de secuencia lo que probablemente indica la existencia de una cisteína. La Tabla III muestra los primeros ocho aminoácidos de la secuencia y el grado de similitud compartido con otras enzimas GOGAT. La mejor correlación fue con la enzima GOGAT dependiente de ferredoxina de maíz.

TABLE III

Alineamiento de las secuencias de la región amino terminal de la enzima NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* con la región amino terminal de diferentes proteínas GOGAT.^a

		Identidad ^b (%)	Referencias
<i>S. cerevisiae</i>	X G V G F V A N		este trabajo
<i>Zea mays</i>	C G V G F V A N	100	c
<i>Antithamnion</i> sp.	C G V G F I A N	85	d
<i>Medicago sativa</i>	C G V G F V A	100	e
<i>Azospirillum</i> <i>brasiliense</i>	C G V G F I A	83	f
<i>E. coli</i>	C G F G L I A	50	g

^a Se refiere a la región amino terminal de las proteínas maduras.

^b No incluye al aminoácido de la posición uno.

^c Sakakibara et al., 1991.

^d Valentin y cols., 1993.

^e Gregerson et al., 1993.

^f Vanoni et al., 1990.

^g Oliver et al., 1987.

Cinética de la enzima GOGAT de *S. cerevisiae*

Las curvas de actividad contra la concentración de substratos fueron hiperbólicas (Fig. 7 y Fig. 8AB). Los valores aparentes de K_m fueron 294 μM para glutamina, 104 μM para 2-oxoglutarato, y 3.8 μM para NADH. La actividad a concentraciones saturantes de substratos exhibieron un pH óptimo amplio entre 6.6 y 7.2 (Fig. 9).

La actividad de GOGAT se inhibió solamente con altas concentraciones de glutamato, malato, succinato y oxalacetato (tabla IV). La azaserina, un inhibidor no-competitivo que alquila enzimas amidotransferasas, produce una inhibición completa de la actividad de la GOGAT de *S. cerevisiae*.

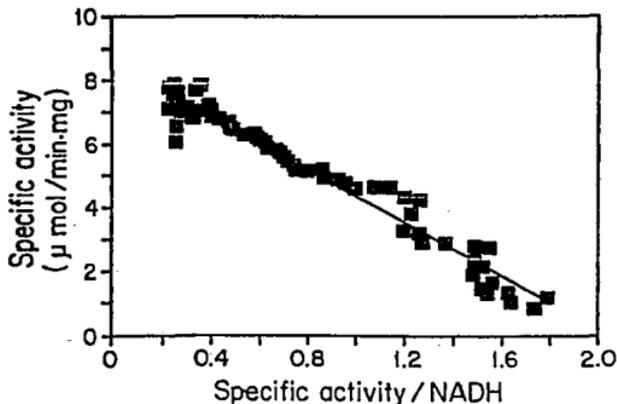


Fig. 7. Integración de un curso temporal para el NADH. Se muestra el ajuste de los valores obtenidos. Se utilizó el ensayo estándar y una concentración de 25 μM de NADH.

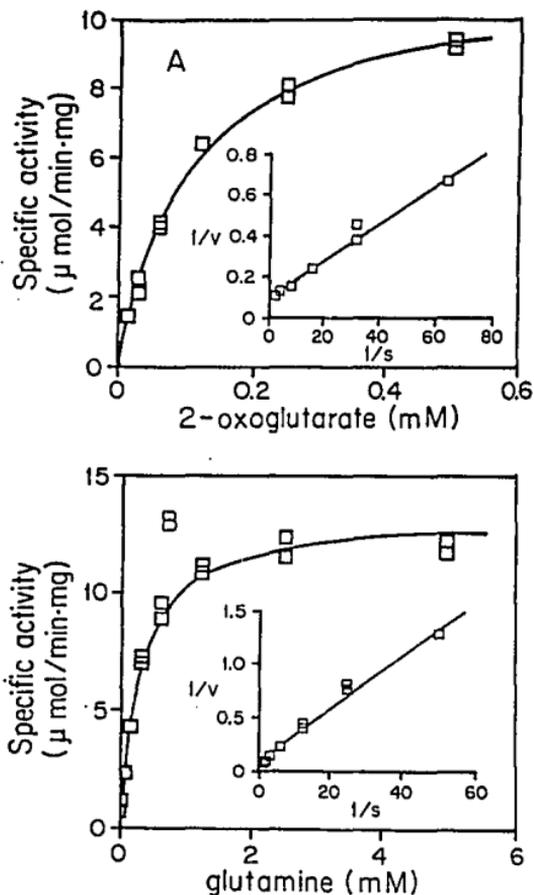


Fig. 8. Cinética de saturación para 2-oxoglutarato y glutamina. Se utilizaron las condiciones de ensayo normales, cambiando las concentraciones de 2-oxoglutarato y glutamina como se especifica en las abscisas de las figuras A y B. Los valores de K_m para el 2-oxoglutarato y glutamina se obtuvieron por análisis de regresión no-lineal como puede observarse en los resultados ajustados a una gráfica de Michaelis-Menten. También se muestran los gráficos de Lineweaver-Burke para ambos substratos.

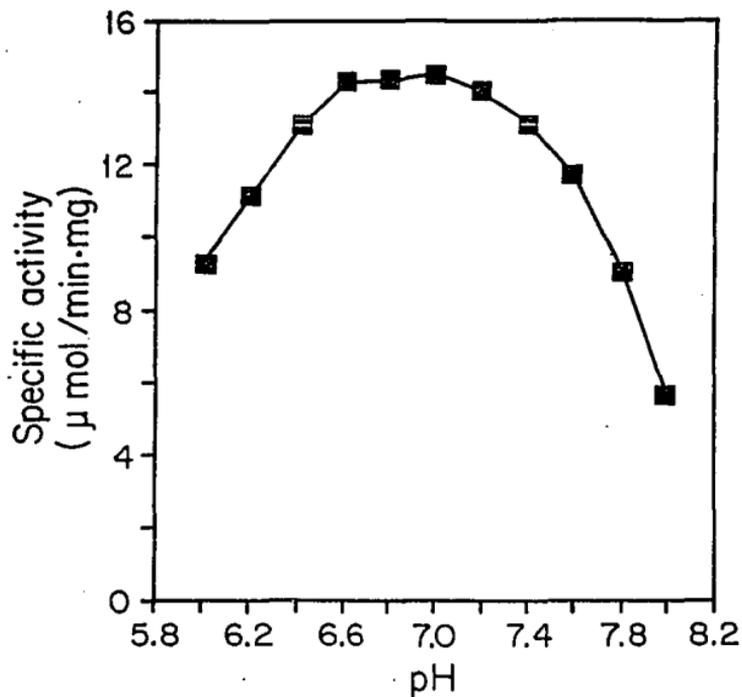


Fig. 9. Efecto del valor de pH sobre la actividad de la enzima NADH-GOGAT de *S. cerevisiae*. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos.

TABLA IV

Inhibición de la enzima NADH-GOGAT de *Saccharomyces cerevisiae* por Glutamato, Malato, Succinato, Oxalacetato y Azaserina^a

Inhibidor	Inhibidor mM	2-oxoglutarato mM	Inhibición %
Glutamato	5-10	1.0	0 a 7
Malato	5-10	1.0	-2 a 4
Succinato	5-10	1.0	-9 a -4
Oxalacetato	5-10	1.0	0 a 2
Glutamato	5-100	0.1	0 a 65
Malato	5-100	0.1	0 a 68
Succinato	5-100	0.1	4 a 53
Oxalacetate	5-10	0.1	0 a 32
Azaserina	5	Todos los sustratos a saturación	100

^a Los ensayos se realizaron en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos (2-oxoglutarato 1 mM; glutamina 5mM; NADH 0.16 mM), a menos que se especifique de otra manera.

Identidad inmunológica entre las enzimas GOGAT de diferentes fuentes

Se obtuvieron anticuerpos policlonales convencionales contra la GOGAT de *S. cerevisiae*. El análisis de extractos crudos por medio de inmunorrélicas tipo Western en SDS-PAGE mostró una banda que reacciona con los anticuerpos y que corresponde en masa molecular al de la proteína purificada (199 kDa) (Fig. 10).

La actividad de GOGAT se purificó parcialmente a partir de levadura para panificación siguiendo los pasos 1, 2 y 3 descritos para la purificación de la enzima de la cepa CN36. Los anticuerpos contra la GOGAT de *S. cerevisiae* tuvieron reacción cruzada con esta preparación y mostraron una banda de 200 kDa (Fig. 10). Además, los anticuerpos no dieron reacción cruzada con la enzima GOGAT purificada a partir de *E. coli* (Fig. 10).

Los anticuerpos obtenidos contra cada-una de las subunidades de la GOGAT de *E. coli* no mostraron reacción cruzada con la GOGAT purificada de *S. cerevisiae*, ni con extractos crudos del nódulo de alfalfa. De manera similar, los anticuerpos contra la enzima NADH-GOGAT de nódulos de alfalfa no tuvieron reacción cruzada con las enzimas purificadas de *S. cerevisiae* y *E. coli* (Fig. 11).

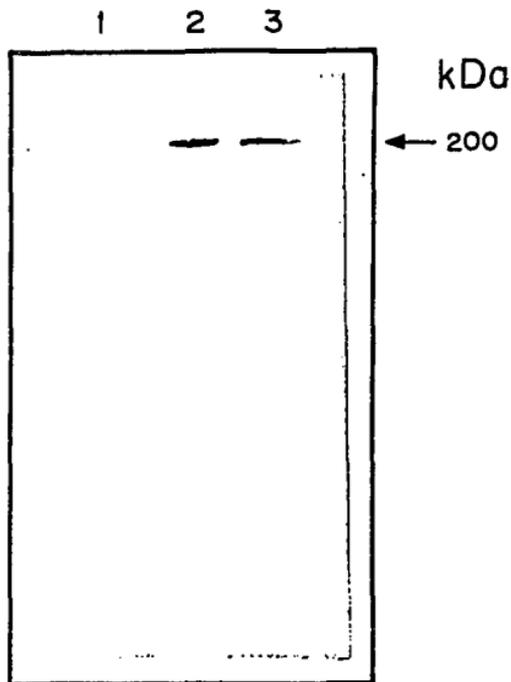


Fig. 10. Análisis por inmunorréplicas tipo Western usando anticuerpos contra la enzima NADH-GOGAT de *S. cerevisiae*. El suero anti-GOGAT de *S. cerevisiae* se probó contra 1 μ g de enzima GOGAT pura de *E. coli* GOGAT (carril 1), 0.5 μ g de enzima GOGAT pura de *S. cerevisiae* (carril 2), y 50 μ g de una fracción parcialmente purificada, con actividad de GOGAT, de levadura para panificación (carril 3). Las proteínas se transfirieron de un gel de SDS-PAGE al 6% a nitrocelulosa. La masa molecular de cada GOGAT se indica en kDa.

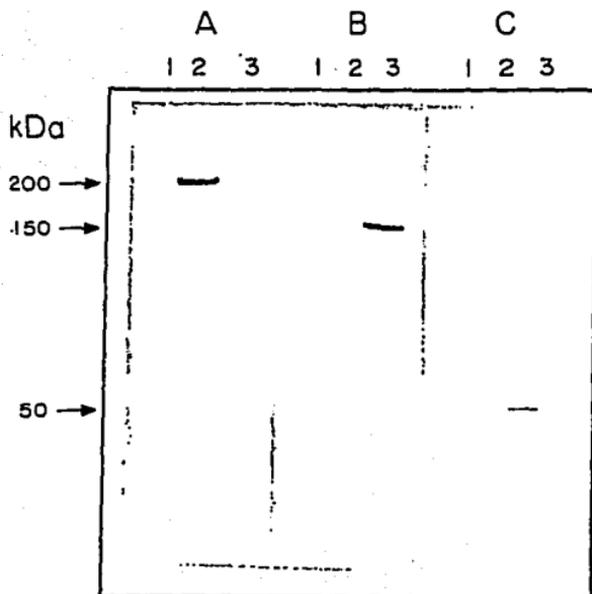


Fig. 11. Inmunorréplicas tipo Western de diferentes proteínas GOGAT probadas con diferentes sueros anti-GOGAT. La enzima GOGAT pura de *S. cerevisiae* (1 μ g) (carriles 1), proteínas solubles de nódulos de alfalfa (100 μ g) (carriles 2), y la enzima NADPH-GOGAT pura de *E. coli* (1 μ g) (carriles 3), se probaron con el suero contra la GOGAT de nódulo de alfalfa (A); con el suero contra la subunidad grande de la GOGAT de *E. coli* (B); y el suero contra la subunidad chica de la GOGAT de *E. coli* (C). Las proteínas se transfirieron de un gel SDS-PAGE al 6% a nitrocelulosa. La masa molecular de cada enzima GOGAT se indica en kDa.

V. DISCUSION

La presencia de actividad de GOGAT en *S. cerevisiae* está bien documentada (Roon y cols., 1974; Masters y Meister, 1982). Así mismo, se han obtenido mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de actividad de GOGAT (Folch y cols., 1989; Miller y Magasanik, 1990). El hecho de que se requieran dos mutaciones que segregan independientemente para que una cepa de levadura pierda la actividad de GOGAT, y la presencia de dos picos de actividad de GOGAT en función del pH sugirieron la existencia de dos proteínas con actividad de GOGAT en levadura. Para definir si *S. cerevisiae* tiene dos isoenzimas, se decidió purificar la enzima GOGAT a partir de la cepa CN36.

El método de purificación empleado permitió obtener solo una enzima GOGAT cuya actividad es óptima en un amplio intervalo de pH. El análisis de la estructura de la enzima GOGAT pura mostró que se encuentra formada por tres subunidades idénticas de 199 kDa. Esta proteína es similar a la de *Neurospora crassa* y a la de plantas superiores, tanto en la masa molecular del monómero como en la especificidad por el Cofactor (Hummelt y Mora, 1980; Chen y Cullimore, 1988; Anderson y cols., 1989; Hayakawa y cols., 1992).

Existe la posibilidad de que en la levadura estén presentes dos isoenzimas de GOGAT y que el método de purificación empleado no haya permitido encontrar la otra enzima, sin embargo, los

resultados obtenidos en las distintas fracciones de la purificación para los valores de K_m y de actividad en función del pH (datos no mostrados), no señalan diferencias con los obtenidos para la enzima pura.

El hecho de haber encontrado una sola proteína con actividad de GOGAT en la cepa CN36, sugiere que los dos picos de actividad óptima a diferentes valores de pH, reportados previamente en esta cepa (Folch y cols., 1989), no se deben a la existencia de dos enzimas GOGAT. Si bien se purificó una enzima GOGAT diferente a la previamente reportada en la literatura, aún no tenemos una hipótesis satisfactoria que explique la existencia de los dos picos de actividad y el tipo de mutaciones que están presentes en la cepa auxótrofa de glutámico.

Masters y Meister (1982) encontraron que la enzima GOGAT purificada a homogeneidad a partir de levadura para panificación, es un dímero de 264 kDa formado por una subunidad grande de 169 y una subunidad chica de 61 kDa. Estos datos sugieren la presencia de dos isoenzimas de GOGAT en levadura: la enzima que purificaron Masters y Meister y la enzima que se reporta en el presente trabajo. Sin embargo, el método de purificación y medición de la actividad que se usó en nuestro trabajo es muy similar al reportado por Masters y Meister (1982), por lo que se debería obtener el mismo resultado. Una de las mayores diferencias en cuanto al método es que se utilizan cantidades de agente reductor mucho menores a las empleadas por ellos: la purificación de

Masters y Meister (1982) se llevó a cabo en presencia de 50 mM de 2-mercaptoetanol y en el presente trabajo se emplea 1 mM de DTT, además de TLCK como inhibidor de proteasas. A este respecto, Sakakibara y cols. (1991) encontraron que la forma monomérica de la enzima Fd-GOGAT de maíz se proteoliza durante la diálisis, dando tres bandas en el análisis tipo Western. Cuando eliminan al 2-mercaptoetanol del amortiguador para diálisis, se protege parcialmente a la enzima de esta proteólisis (Sakakibara y cols., 1991). Por otro lado, Marqués y cols. (1992) purificaron la enzima GOGAT de *Synechococcus* sp. y encontraron dos bandas con actividad de GOGAT en geles nativos y dos bandas, que difieren en 5 kDa, en geles de SDS-PAGE. Debido a que existen altos niveles de degradación proteolítica en los extractos de cianobacterias y a que la cantidad del péptido de menor masa molecular varía de una purificación a otra, ellos proponen que este péptido es un producto de degradación de la enzima nativa, aún a pesar de la presencia del inhibidor de proteasas PMSF durante el procedimiento de extracción. La banda que migra más lento en SDS-PAGE, tiene una masa molecular aparente de 160 kDa, muy similar al valor determinado para la enzima nativa (156 kDa). Estos autores concluyen que la GOGAT de *Synechococcus* está formada de un solo polipéptido de 160 kDa.

Masters y Meister (1982) reportan que la enzima es muy inestable en las últimas etapas de la purificación. Nosotros encontramos que la enzima de 199 kDa es estable y que se puede almacenar a -70°C durante varios meses en amortiguador de

fosfatos 20 mM, EDTA 1 mM y 2 mM de 2-oxoglutarato, sin agente reductor, inhibidores de proteasas ni glicerol. El haber purificado una enzima diferente siguiendo prácticamente el mismo método de purificación, junto con los resultados de Sakakibara y cols. (1991) y Marqués y cols. (1992), nos permiten sugerir que los datos de masa molecular de la enzima purificada por Masters y Meister estén incorrectos y se deban a una proteólisis parcial de la proteína. Una opción más para explicar los resultados de Masters y Meister (1982) es que ellos no hayan purificado a homogeneidad la enzima y que lo que están interpretando como subunidades de GOGAT sean otras proteínas contaminantes.

Para determinar si la enzima compuesta por monómeros de 199 kDa se encuentra presente en levadura para panificación, se realizaron análisis tipo Western con el anticuerpo elaborado contra la proteína de 199 kDa. Los anticuerpos presentaron reacción cruzada tanto con extractos crudos obtenidos a partir de levadura para panificación (datos no mostrados) como con una preparación semipurificada que contiene actividad de GOGAT, mostrando una única banda de 200 kDa. Estos resultados apoyan la hipótesis de que en levadura para panificación existe una enzima GOGAT de 200 kDa y que la GOGAT de dos subunidades reportada por Masters y Meister (1982) se debe a proteólisis parcial de la enzima de 200 kDa.

La secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la enzima GOGAT purificada a partir de la cepa CN36, tiene un

gran porcentaje de similitud con el amino terminal de proteínas GOGAT de distintas especies, en particular con la GOGAT de maíz. Por ser esta región importante desde el punto de vista catalítico, y por tanto, sumamente conservada entre las distintas enzimas GOGAT, este resultado es una fuerte evidencia que identifica a la enzima purificada en el presente trabajo como una enzima GOGAT. En todos los casos reportados, el primer aminoácido de la proteína madura es una cisteína. Este aminoácido parece desempeñar un papel importante en la unión a glutamina, por lo que posiblemente el residuo uno de la GOGAT de levadura sea una cisteína. El residuo uno no se determinó durante el análisis de la secuencia de aminoácidos posiblemente porque se degradó durante la hidrólisis ácida. Cuando esto ocurre, es indicativo de la presencia de cisteína o triptofano. Para determinar si este aminoácido es una cisteína, se puede utilizar la piridiletilación con 2 o 4 vinilpiridina, que produce un derivado más estable al ácido. Otra modificación es la oxidación con Na 2-bromoetanosulfonato para producir residuos S-sulfoetilados que son más estables a la hidrólisis ácida. (Schlesinger, 1988)

La secuencia de aminoácidos del amino terminal se puede utilizar para encontrar el gen estructural. Los trabajos realizados para obtener mutantes en la actividad de GOGAT y posteriormente la obtención del gen por complementación de la actividad en dichas cepas, suponían la presencia de dos subunidades de la enzima, y por lo tanto, la existencia de dos genes estructurales (Folch y cols., 1989). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la composición de

la enzima y a su masa molecular permiten inferir que existe un gen estructural que codifica para un monómero de 199 kDa, que corresponde a aproximadamente 1800 aminoácidos y por tanto a un gen de 6000 pares de bases.

Los valores de K_m encontrados para los sustratos son comparables a los que se han señalado para las enzimas NADH-GOGAT de plantas (ver tabla 2 en la Introducción). La enzima NADPH-GOGAT de bacterias tiene un valor menor de K_m para el 2-oxoglutarato y valores muy parecidos para la glutamina y el cofactor (ver tabla 1 en la Introducción). La curva de actividad contra pH es amplia y similar a las señaladas para otras enzimas GOGAT (ver tablas 1, 2 y 3 en la Introducción), aunque el valor del pH óptimo es un poco más ácido y muestra una meseta entre 6.6 y 7.2.

Los resultados al usar inhibidores de la actividad de GOGAT están de acuerdo con los señalados para la NADH-GOGAT de alfalfa y la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Miller y Stadtman, 1972; Anderson y cols., 1989). La azaserina, que es un inhibidor no-competitivo de enzimas amidotransferasas, inhibe completamente la actividad de la GOGAT de levadura cuando se utiliza en concentraciones equivalentes a las de glutamina. Todas las demás sustancias empleadas inhibieron la actividad de GOGAT a altas concentraciones con respecto a la concentración de 2-oxoglutarato. Se puede concluir que estas sustancias no son

inhibidores de la actividad de GOGAT a concentraciones fisiológicas.

La masa molecular de la proteína en su estado nativo se determinó por filtración en gel. Esta técnica separa a las proteínas por su masa molecular y por su forma. La resina de Sefacril S-300 se utiliza en especial para separar proteínas de forma globular y masa molecular entre 10 y 1000 kDa. El marcador de masa molecular más alto que se empleó para calibrar la resina fue de 669 kDa. La enzima GOGAT eluye en una zona muy cercana al marcador de 669 kDa donde un cambio pequeño en el volumen de elución de las proteínas genera cambios grandes en la masa molecular. Este es un inconveniente para determinar exactamente el valor de la masa molecular del oligómero, sin embargo existen varias evidencias que permiten confiar en el resultado. La columna de Sefacril se calibró con 6 marcadores de masa molecular y dió un coeficiente de correlación lineal de 0.98 lo que indica que el comportamiento de la elución de las proteínas en función de su masa molecular es muy consistente. Se aplicó, en la misma columna, una muestra de la enzima GOGAT de *E. coli* purificada a homogeneidad y se encontró un valor de masa molecular muy aproximado al valor de masa molecular estimado por la secuencia de aminoácidos de la proteína. Este último resultado demuestra que la resina es capaz de discernir entre la masa molecular de 850 kDa de la GOGAT de *E. coli* y la masa molecular de 669 kDa del marcador. La masa determinada para la GOGAT de levadura corresponde exactamente a un trímero; no es un valor cercano al

dímero ni al tetrámero. Si el valor determinado por este método es incorrecto, podría deberse a que la forma molecular de la proteína no fuera globular y por tanto influyera en la migración de la proteína, retardándola si es un dímero o adelantándola si es un tetrámero. Este problema provocado por la forma molecular no se puede eliminar al emplear una resina que separe proteínas con masas moleculares mayores (p. ej. 10 a 4000 kDa), ni por métodos de centrifugación. Una técnica que se ha utilizado recientemente para determinar masas moleculares con gran exactitud, independientemente de la forma molecular, es la inactivación por radiaciones (Kempner, 1993). Los resultados reportados por Roon y cols. (1974) sobre la purificación parcial de la enzima GOGAT a partir de la cepa X2180 de *S. cerevisiae*, utilizando columnas de filtración en gel, mostraron formas oligoméricas de la enzima de mayor masa molecular cuando aumenta la concentración de proteína en la columna. Este resultado apoya a lo obtenido con la enzima pura en el presente trabajo.

La masa determinada por SDS-PAGE corresponde a 199 kDa, que también es un valor muy cercano al último marcador de masa molecular de 224 kDa y se encuentra en la zona del gel donde cambios pequeños en la distancia recorrida corresponden a cambios grandes en el masa molecular. Por esta razón se emplearon geles de bajo porcentaje de acrilamida (6%). Los coeficientes de correlación para las regresiones lineales de las curvas de calibración de los geles son de 0.98 por lo que también podemos confiar en este resultado. Para conocer la masa molecular del

monómero en su forma nativa se puede utilizar una columna de filtración en gel y distintas concentraciones de enzima: a menor concentración de proteína el grado de asociación es menor y por tanto se podrían observar las formas oligoméricas del dímero y el monómero. A concentraciones mayores la asociación es mayor hasta obtener la estructura trimérica, determinada en el presente trabajo. Sin embargo, la forma de la proteína también influye en el resultado final. La masa exacta del monómero se podrá obtener cuando se determinen los datos de la secuencia de la proteína.

A pesar de la similitud en la secuencia de aminoácidos de la GOGAT de *E. coli* y de alfalfa (Gregerson y cols., 1993), sus respectivos anticuerpos no mostraron reacción cruzada. Lo mismo ocurre cuando se utilizan los anticuerpos contra la GOGAT de *E. coli* y de levadura, uno y otro no son capaces de reconocer a la otra enzima. Tampoco hay reacción cruzada entre el anticuerpo contra la GOGAT de alfalfa y la enzima pura de levadura. Estos resultados indican que los anticuerpos son específicos para la proteína contra la cual fueron elaborados. Posiblemente la estructura del estado desnaturalizado de cada enzima sea muy diferente, y muestra distintos epitopes antigénicos. Se obtiene reacción cruzada cuando se emplea el anticuerpo para la GOGAT de la cepa CN36 de levadura contra extractos de levadura para panificación es decir, contra proteínas de un organismo de la misma especie.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo describe la purificación y caracterización bioquímica de una enzima GOGAT de levadura que no ha sido reportada previamente en la literatura. Esta enzima es diferente a la purificada por Masters y Meister (1982) tanto en la masa molecular del monómero, como en la composición del oligómero, y se asemeja a la enzima GOGAT de nódulos de plantas y a la del hongo *Neurospora crassa*. El estudio con anticuerpos demostró que la enzima de 199 kDa también está presente en extractos obtenidos a partir de levadura para panificación. Existe la posibilidad de que la enzima purificada por Masters y Meister (1982) sea producto de una degradación.

El análisis realizado durante cada paso de la purificación señala que no existe otra enzima con actividad de GOGAT en la cepa CN36. Aunque este resultado es confiable, se debe esperar a realizar la interrupción del gen que codifica para esta enzima de 200 kDa, para concluir si están presentes una o dos enzimas en levadura.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten inferir que en *S. cerevisiae* existe un solo gen estructural de GOGAT que tiene aproximadamente 6000 pares de bases. Así mismo servirán de base para estudiar el papel fisiológico de GOGAT en levadura.

VII. PERSPECTIVAS

Los estudios detallados sobre la estructura y función de la enzima GOGAT de levadura se dificultan por el tamaño de la enzima y por la poca cantidad de proteína que puede purificarse. De esta manera, la clonación y obtención de la secuencia del gen que codifica para la enzima GOGAT de levadura es esencial tanto para estudiar la secuencia completa de aminoácidos, como para sobreexpresar este complejo enzimático.

Una vez obtenido el gen estructural completo se le puede sobreexpresar para purificar suficiente cantidad de proteína y llevar a cabo estudios estructurales como son la presencia de flavinas y complejos hierro-azufre, reforzar los datos sobre la masa molecular del monómero y el oligómero, determinar si el monómero es activo y si la enzima presenta distinto comportamiento en función de la presencia de iones Cl^- , así como buscar posibles moduladores de la actividad.

Utilizando un fragmento del gen estructural de GOGAT se podrá llevar a cabo la interrupción de dicho gen en distintas cepas de levadura, lo cual permitirá estudiar el papel fisiológico de la enzima bajo diferentes condiciones de cultivo.

VIII. REFERENCIAS

- Adachi, K. y Suzuki, I. (1977) *J. Bacteriol.* 129:1173-1182
- Anderson, M.P., Vance, C.P., Heichel, G.H., and Miller, S.S. (1989) *Plant Physiol.* 90:351-358
- Avila, C., Botella, J.R., Cánovas, F.M., Núñez de Castro, I. y Valpuesta, V. (1987) *Plant Physiol.* 85:1036-1039
- Barel, I., y MacDonald, D.W. (1993) *FEMS Microbiol. Letts.* 133:267-272
- Benny, A. G., and Boland, M.J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79:355-362
- Bogonez, E., Satrustegui, J., y Machado, A. (1985) *J. Gen. Microbiol.* 131:1425-1432
- Boland, M.J. (1978) *Aust. J. Plant Physiol.* 5:553-559
- Carlberg, I., y Nordlund, S. (1991) *Biochem. J.* 279:151-154
- Chen, F.-L. and Cullimore, J. V. (1988) *Plant Physiol.* 88:1411-1417
- Denton, M.D., y Ginsburg, A. (1970) *Biochemistry* 9:617
- Elmerich, C., y Aubert, J.P. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:371-376
- Folch, J.L., Antaramian, A., Rodríguez, L., Bravo A., Brunner, A. y González A. (1989) *J. Bacteriol.* 171:4927-4935
- Galván, F., Márquez, A.J. y Vega, J.M. (1984) *Planta* 162:180-187
- Georgakopoulos, T., y Thireos, G. (1992) *EMBO J.* 11:4145-4152
- Geray, L.E., y Meister, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:3501-3508
- González, A., Membrillo-Hernández J., Olivera H., Aranda C., Macino G. y Ballarín P. (1992) *Mol. Microbiol.* 6:301-308
- González-Halphen, D., Lindorfer, M.A., y Capaldi, R.A. (1988) *Biochemistry* 27:7021-7031
- González-Halphen, D., Vázquez-Acevedo, M.A., y García Ponce, B. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:3870-3876

- Gosset, G., Merino, E., Recillas, F., Oliver, G y Becerril B. (1989) *Protein Seq Data Anal* 2:9-16
- Green, J., y Large, P.J. (1984) *J. Gen. Microbiol.* 133:3219-3228
- Gregerson, R.G., Miller, S.S., Twary, S.N., Gantt, J.S., y Vance, C.P. (1993) *The Plant Cell* 5:215-226
- Groat, R.G., y Vance, C.P. (1981) *Plant Physiol.* 67:1198-1205
- Hayakawa, T., Yamaya, T., Kamachi, K., y Ojima, K. (1992) *Plant Physiol.* 98:1317-1322
- Hemmila, I.A. y Mantsälä, P.I. (1978) *Biochem. J.* 173:45-52
- Hirasawa, M. y Tamura, G. (1984) *J. Biochem.* 95:983-994
- Hirasawa, M., Chang, K.T. y Knaff, D.B. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 286:171-177
- Holmes, A.R., Collings, A., Farnden, K.J.F., y Shepherd, M.G. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:1423-1430
- Hummelt, G., y Mora, J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694
- Kendall, A. C., Wallsgrove, R. M., Hall, N. P., Turner, J. C., and Lea, P. J. (1986) *Planta* 168:316-323
- Kempner, E.S. (1993) *TIBS* 18:236-239
- Knaff, D.B., Hirasawa, M., Ameyibor, E., Fu, W., y Johnson, M.K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15080-15084
- Kusnan, M.B., Berger, M.G., y Fock, H.P. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133:1235-1242
- Lomnitz, A., Calderon, J., Hernández, G., y Mora, J. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133:2333-2340
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Mäntsälä, P. y Zalkin, H. (1976a) *J. Bacteriol.* 126:539-541
- Mäntsälä, P. y Zalkin, H. (1976b) *J. Biol. Chem.* 251:3294-3299
- Marquès S., Florencio, F.J. y Candau P. (1992). *Eur. J. Biochem.* 206:69-77.
- Masters D.S. y Meister A. (1982) *J. Bacteriol.* 257:8711-8715
- Matho, T., Ida, S., Takahashi, E. (1980) *Plant Cell Physiol.* 21:1461-1474

- Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038
- Meers, J.L., Tempest, D.W. y Brown, C.M. (1970) *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194
- Mei, B., y Zalkin, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:16613-16619
- Mei, B., y Zalkin, H. (1990) *J. Bacteriol.* 172:3512-3514
- Miflin, B.J. y Lea, P.J. (1977) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:299-329
- Miller R.E. y Stadtman E.R. (1972) *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419
- Miller, S.M., y Magasanik, B. (1990) *J. Bacteriol.* 172:4927-4935
- Nagatani, H., Shimizu, M., y Valentine, R.C. (1971) *Arch. Microbiol.* 79:164-175
- Oliver G., Gosset G., Sánchez-Pescador R., Losoya E., Ku, L.M., Flores, N., Becerril, B., Valle, F. y Bolívar, F. (1987) *Gene* 60:1-11
- Pelanda, R., Vanoni, M.A., Perego, M., Piubelli, L., Galizzi, A., Curti, B., y Zanetti, G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3099-3106
- Ratti, S., Curti, B., Zanetti, G. y Galli, E. (1985) *J. Bacteriol.* 163:724-729
- Rendina, A.L., y Orme-Johnson, W.H. (1978) *Biochemistry* 17:5388-5393
- Robertson, J.G., Warburton, M.P., y Farnden, K.J.F. (1975) *FEBS Letters* 55:33-37
- Roon, R.J., Even, H.L. y Larimore, F. (1974) *J. Bacteriol.* 118:89-95
- Sakakibara, H., Watanabe, M., Hase, T., y Sugiyama, T. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:2028-2035
- Sakakibara, H., Kawabata, S., Takahashi, H., Hase, T., y Sugiyama, T. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33:49-58
- Sakamoto, N., Kotre, A.M. y Savageau, M.A. (1975) *J. Bacteriol.* 124:775-783
- Schägger, H., Link, Th.A., Engel, W.D., y von Jagow, G. (1986) *Methods Enzymol.* 126:224-237
- Senior, P.J. (1975) *J. Bacteriol.* 123:407-418

- Singhal, R.K., Krishnan, I.S. y Dua R.D. (1989) *Biochemistry* 28:7928-7935.
- Schreier, H.J., y Bernlohr, R.W. (1984) *J. Bacteriol.* 160:591-599
- Schlesinger, D.H. (1988) *Macromolecular sequencing and synthesis. Selected methods and applications.* Alan R. Liss, Inc., New York.
- Stookey, L.L. (1970) *Anal. Chem.* 42:779-781
- Suzuki, A. y Gadai, P. (1982) *Plant Physiol.* 69:848-852
- Suzuki, A., Vidal, J., y Gadai, P. (1982) *Plant Physiol.* 70:827-832
- Suzuki, A., y Gadai, P. (1984) *Physiol. Veg.* 22:471-486
- Tamura, G., Oto, M., Hirasawa, M., y Aketagawa, J. (1980) *Plant Sci. Lett.* 19:405-507
- Tempest, D.W., Meers, J.L., y Brown, C.M. (1970) *Biochem. J.* 117:405-507
- Trotta, P.P., Platzer, K.E.B., Haschemeyer, R.H., y Meister, A. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:4607-4611
- Valentin, K.U., Kostrzewa, M., y Zetsche, K. (1993). *Plant Mol. Biol.* 23:77-85.
- Vanoni, M.A., Negri, A., Zanetti, G., Ronchi, S., y Curti, B. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* 1039:374-377
- Vanoni, M.A., Rescigno, M., Nuzzi, L., Zanetti, G. y Curti, B. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202:181-189
- Vanoni, M.A., Edmondson, D.E., Zanetti, G., y Curti, B. (1992) *Biochemistry.* 31:4613-4623
- Wang, R., y Nicholas, D.J.D. (1985) *Phytochemistry.* 24:1133-1139
- Yelton, M., y Yoch, D.C. (1981) *J. Gen. Microbiol.* 123:335-342
- Zwart, K.B. y Harder, W. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:3157-3169

APENDICE

GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

La cromatografía en columna es un método para separar moléculas. Con este fin se utiliza una columna que se prepara con un material que absorbe las moléculas selectivamente, de acuerdo a las diferencias que existen en su estructura química. La mezcla de moléculas se coloca en la parte superior de la columna y se lava lentamente, a través de la columna, con el amortiguador apropiado. Este proceso de elución continúa y las fracciones que salen de la columna se colectan por separado. Las moléculas que no se absorben o que se absorben débilmente son las que eluyen primero. Aquellas que se absorben fuertemente eluyen después. Algunas veces es necesario cambiar la composición del amortiguador para remover las moléculas que están más fuertemente unidas. El material de la columna y el método de elución dependen del tipo de separación deseado.

Cromatografía de intercambio iónico.

Este método se usa para separar moléculas sobre la base de su carga eléctrica. Se emplean resinas de intercambio iónico, que pueden ser polianiónicas o policatiónicas. Las de intercambio aniónico utilizan el grupo dietilaminoetil⁺ (DEAE), que confiere a la resina una carga positiva. Las de intercambio catiónico

utilizan carboximetil⁻ y sulfoetil⁻. Estos grupos iónicos funcionales se adhieren a distintas matrices como pueden ser la celulosa, el dextrán y la agarosa. La DEAE-Sefarosa y el DEAE-BioGel A están fabricados en matrices de agarosa.

Cromatografía de hidrofobicidad.

Los geles que se utilizan tienen grupos alquilo y aminoalquilo que permiten la interacción hidrofóbica con las proteínas. Las columnas se trabajan bajo condiciones que favorecen estas interacciones hidrofóbicas, como es el utilizar un amortiguador con sulfato de amonio. Para eluir la muestra, la fuerza iónica del amortiguador se va disminuyendo y se puede adicionar etilenglicol para eluir proteínas que están fuertemente adheridas a la columna. Una de las resinas que se emplean es la fenil-Sefarosa.

Cromatografía de afinidad.

Muchas proteínas muestran una fuerte interacción con otras moléculas, por ejemplo con análogos de sus substratos o con cofactores. Estas moléculas unidas covalentemente a una matriz de material inerte, permiten atrapar a la proteína deseada. Todas las proteínas que no se unen a este substrato pasan a través de la columna. La proteína capturada puede eluirse usando en el amortiguador las moléculas libres, o bien otro agente que rompa las interacciones entre las moléculas de la resina y la proteína en cuestión.

Las resinas de Agarosa roja y de Sefarosa azul tienen covalentemente unidos grupos que tiene afinidad por enzimas que requieran NAD⁺ y NADP⁺.

Filtración en gel.

Este método es conveniente para separar macromoléculas de diferente tamaño. La porosidad del gel se escoge de manera que las moléculas más pequeñas de la mezcla puedan penetrar por las partículas del gel y las más grandes pasen en la fase líquida fuera de las partículas del gel. A medida que la muestra pasa por la columna, las moléculas más grandes se mueven más rápido y las pequeñas más lento. La columna se puede calibrar con marcadores de masa molecular conocida, y por tanto, permite obtener el valor de masa molecular de la proteína de interés.

La resina Sefacril S-300 es una matriz rígida y estable de dextrán-bisacrilamida, que se utiliza para trabajar con proteínas globulares que tienen entre 10 y 1 000 kDa.