

SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUTAMINO SINTETASA  
EN NEUROSPORA CRASSA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Investigación Biomédica Básica)

PRESENTA:

Ma. del Carmen M. Quinto Hernández  
Colegio de Ciencias y Humanidades  
Unidad Académica de los Ciclos  
Profesionales y de Postgrado

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

1977



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

SINTESIS Y DEGRADACION DE GLUTAMINO SINTETASA  
EN NEUROSPORA CRASSA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Investigación Biomédica Básica)

PRESENTA:

Ma. del Carmen M. Quinto Hernández  
Colegio de Ciencias y Humanidades  
Unidad Académica de los Ciclos  
Profesionales y de Postgrado

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

1977

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Jaime Mora Celis

Secretario: Dr. Ruy Pérez Tamayo

Vocal: Dr. Rafael Palacios de la Lama

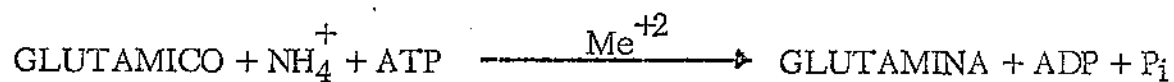
1er. Suplente: Dr. Romilo Espejo

2do. Suplente: Dr. Librado Ortiz Ortiz

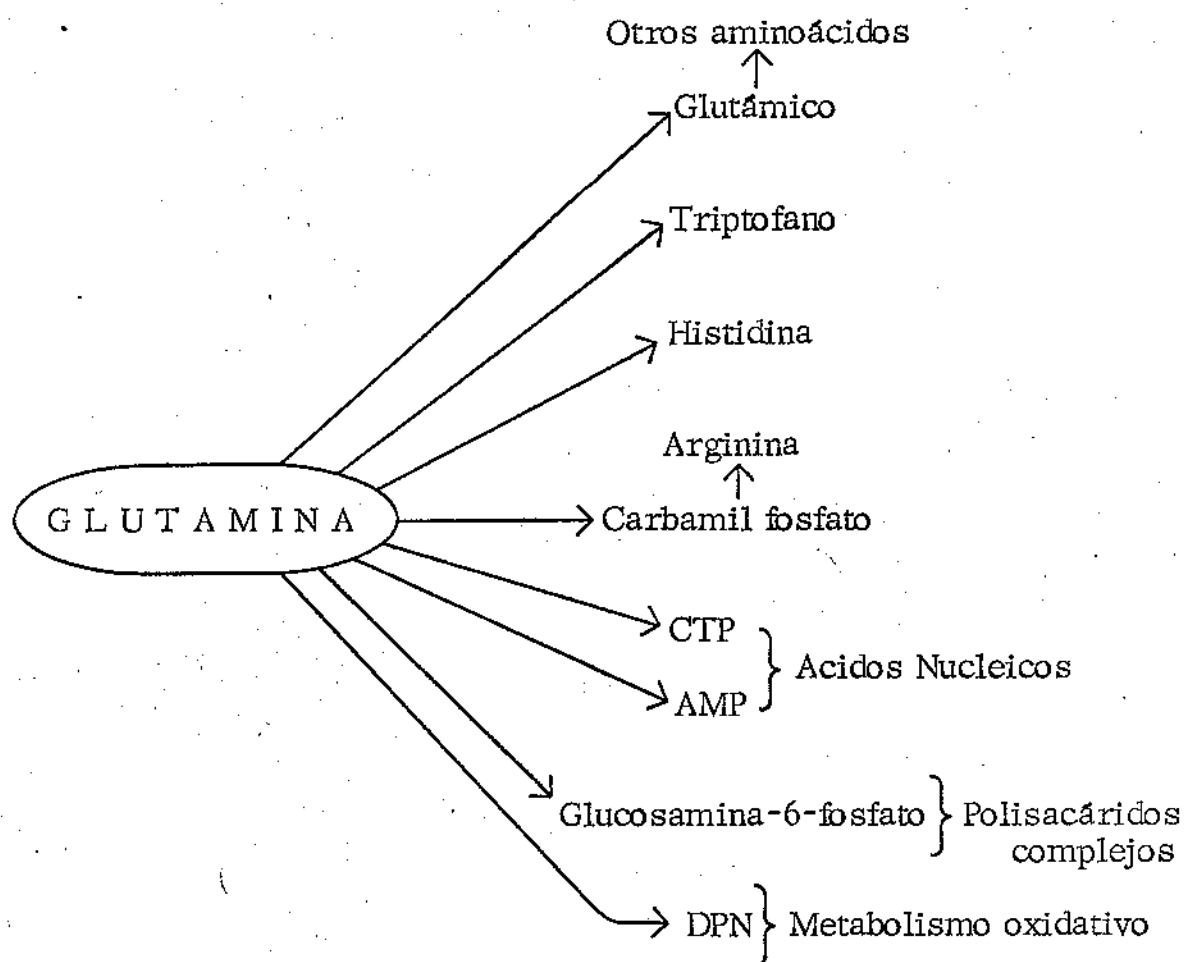
## INTRODUCCION.

El interés de estos estudios está enfocado básicamente hacia un conocimiento claro de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión del genoma en eucariotes. Así los puntos claves en regulación se antojan, dada la importancia de los procesos: transcripción, traducción y síntesis de la proteína, así como el recambio de cada una de las macromoléculas que intervienen en cada proceso.

Un sistema enzimático parece ser un modelo bastante atractivo para llevar a cabo este tipo de estudios dados los mecanismos de regulación que una enzima debe tener para mantener un cierto nivel dentro de la célula. La enzima glutamino sintetasa ( E.C. 6.3.1.2.) desempeña un papel fundamental en el metabolismo nitrogenado tanto en procariotes ( 1 ), como en eucariotes ( 2 ). La reacción que se considera la más importante, es la llamada biosintética ( 3 ) que cataliza la conversión de glutámico a glutamina:



siendo este paso de suma importancia, ya que la glutamina es el donador del grupo amido para la biosíntesis de diversos metabolitos nitrogenados como se muestra en el siguiente esquema:



La glutamino sintetasa es pues, un punto clave en el metabolismo celular, por lo que ha sido ampliamente estudiada para entender a fondo sus mecanismos regulatorios. Una de las enzimas más estudiadas es la glutamino sintetasa de Escherichia coli, la cual se sabe que puede ser regulada por lo menos por cuatro mecanismos diferentes: a) represión y derepresión de su biosíntesis por alteraciones en la fuente de nitrógeno en la que el microorganismo se crezca ( 4 - 6 ); b) la interconversión de la forma relajada (inactiva) a la forma activa dependiendo del cation divalente presente ( 7 - 9 ); c) retroinhibición por diversos productos finales del metabolismo de glutamina ( 10) y d) alteraciones covalentes de la enzi

mã por mecanismos de adenilaci3n o deadenilaci3n de residuos de tirosina (11, 12), teniendo cambios importantes en la actividad catalitica de la enzima. A su vez, las enzimas que catalizan las reacciones de adenilaci3n y deadenilaci3n estãn sujetas a mecanismos de control muy finos, en cascada ( 7, 13, 14 ). La actividad de la glutamino sintetasa en E. coli varia aproximadamente 20 veces en funci3n de la fuente de nitr3geno que se est3 usando para crecer ( 4, 5 ). En un medio rico en nitr3geno teniendo concentraciones elevadas de amonio (70 mM) el nivel de enzima es bajo, cuando las c3lulas se cultivan en presencia de glutãmico o en bajas concentraciones de amonio (4 mM), la actividad especifica de la enzima aumenta aproximadamente 20 veces. A pesar de que estos resultados han sido confirmados ( 6 ) es diflcil de evaluar su significado, ya que cambios en las fuentes de nitr3geno empleadas para el crecimiento, causan alteraciones en la naturaleza de la glutamino sintetasa como son la adenilaci3n (forma inactiva) y la deadenilaci3n (forma activa), as3 como alteraciones en la cantidad de enzima sintetizada.

Magasanik y col. ( 15 ) han encontrado que en Klebsiella aerogenes la glutamino sintetasa estimula la s3ntesis de enzimas que catalizan la degradaci3n de aminoãcidos a glutãmico, que ademãs inhibe la s3ntesis de la glutamato deshidrogenasa y desempeña un papel importante en la inhibici3n de su propia s3ntesis por amonio y glutamina.

En diferentes especies de Bacillus, Lactobacillus, Saccharomyces y Candida utilis se ha demostrado que las cantidades de glutamino sintetasa

producidas dependen de la fuente de nitrógeno que los organismos usen para crecer. Estos cambios en actividad de la enzima no pueden explicarse por mecanismos de adenilación o deadenilación ya que no se han encontrado en estos microorganismos ( 16, 17 ). Bacillus licheniformis tiene ocho veces más actividad de glutamino sintetasa cuando se crece en nitrato de sodio, comparada con una concentración equivalente de amonio ( 18 ). La síntesis de glutamino sintetasa en Bacillus subtilis disminuye cuando se crece en presencia de una fuente de nitrógeno que sea rápidamente metabolizada como glutamina o asparagina y aumenta cuando se limita de nitrógeno ( 19, 20 ). En Saccharomyces cerevisiae el nivel de glutamino sintetasa es reprimido cuando se crece en glutamina, asparagina o amonio como únicas fuentes de nitrógeno; cuando se crece en glutámico, aspártico o metionina, se aumenta la síntesis de la glutamino sintetasa ( 21 ). En C. utilis la cantidad de enzima es ajustada dependiendo de la asequibilidad de amonio en el medio de cultivo, cualquier cambio en la disponibilidad de amonio tiene como resultado un reajuste en el nivel de enzima; cuando C. utilis crece en diferentes fuentes de nitrógeno hay una correlación inversa entre la actividad de la enzima glutamino sintetasa y la poza de glutamina dentro de la célula ( 17 ).

La glutamino sintetasa de procariotes tiene como promedio un peso molecular de 592 000 consistiendo de 12 subunidades idénticas de 50 000 de peso molecular ( 5, 9 ) arregladas en dos planos hexagonales ( 22 ).



Como se mencionó antes, en E. coli y microorganismos Gram-negativos, la enzima está sujeta a mecanismos de adenilación y deadenilación; en cambio en B. subtilis y otros microorganismos Gram-positivos en donde la estructura oligomérica de la enzima es también un dodecámero no se ha reportado tal mecanismo regulatorio ( 23 ). En organismos eucariotes la glutamino sintetasa ha sido descrita como un octámero de peso molecular que varía según la especie entre 350 000 y 390 000 ( 24 ) con subunidades idénticas de 44 000 a 49 000 de peso molecular; en los eucariotes hasta ahora estudiados no se ha descrito en ningún caso la forma adenilada de la enzima.

En animales los mecanismos que regulan la glutamino sintetasa son muy diferentes a los observados en E. coli. Como ya hemos señalado, la glutamino sintetasa de eucariotes no existe en la forma adenilada y muchos inhibidores encontrados para la enzima de bacterias no tienen efecto sobre la de mamíferos ( 24 ). En los tejidos animales la concentración de amonio es generalmente mantenida a un nivel muy bajo y en contraste, tienen elevadas concentraciones de glutamina. Se ha reportado que la actividad específica de la glutamino sintetasa en células en cultivo de hamster chino, está relacionada inversamente con la concentración de glutamina en el medio de cultivo ( 25 ). La actividad específica de la enzima aumenta de 8 a 10 veces cuando la glutamina es excluida del medio de cultivo. En base a experimentos de titulación de la enzima con anticuerpos, se concluyó que éstos cambios en actividad de la enzima se deben a degradación de la

glutamino sintetasa debido a la presencia de glutamina. Existen estudios en cultivo de células de hepatoma en una subclona que no necesita glutamina para crecer, en donde la actividad específica de la enzima es aumentada al administrar dexametasona ( corticoesteroide sintético ) y disminuida por glutamina ( 26 ). Este aumento en actividad de la enzima con la hormona requiere de la síntesis de ácido ribonucleico, por otra parte, la cinética de decaimiento de la actividad enzimática y los efectos de inhibidores, sugieren que la glutamina causa aceleración ya sea en la inactivación o en la degradación de la enzima. El sistema de retina de pollo es posiblemente de los más estudiados. En la fase temprana de desarrollo del embrión de pollo, la actividad de glutamino sintetasa en la retina neural es baja y aumenta progresivamente llegando a ser 100 veces más que el nivel inicial ( 27 ). El aumento en glutamino sintetasa se correlaciona con diferenciación funcional y con maduración de la retina neural ( 28 ). Sin embargo, un rápido aumento en glutamino sintetasa puede ser inducido precozmente en cultivo de tejido de retina crecido en presencia de hidrocortisona u otros 11-  $\beta$ -OH-corticoesteroides ( 28 ). Se encontró que la inducción de la actividad de glutamino sintetasa requiere de transcripción ( 29 - 31 ) y es debida a un aumento progresivo en la velocidad de síntesis y no a una degradación menor o a la activación de precursores de la enzima previamente sintetizados. Para tener una prueba directa de la presencia de grandes cantidades de RNA mensajero funcional en el tejido de retina inducida, se tradujo el

RNA mensajero parcialmente purificado en un sistema de germen de trigo ( 32 ) y se demostró que la hidrocortisona eleva el nivel de ácido ribonucleico mensajero de glutamino sintetasa en células inducidas.

La glutamino sintetasa de hígado de rata ha sido purificada y se ha demostrado que está sujeta a retroinhibición por los productos de varias vías metabólicas que utilizan glutamina y a activación por alfa-cetoglutarato y por citrato ( 24 ).

Los niveles de glutamino sintetasa en ciertos tejidos y células en cultivo son alterados por glutamina ( 33 - 39 ), corticoesteroides ( 28, 36, 38 - 41 ) y adenosín 3' 5' monofosfato cíclico ( 38, 42 ). Como se puede dar uno cuenta, la información que se tiene hasta estos momentos en eucariotes es más bien fragmentaria.

Con el fin de entender mejor los mecanismos que controlan los niveles de la enzima glutamino sintetasa en eucariotes, hemos escogido como modelo de estudio la glutamino sintetasa del hongo Neurospora crassa el cual ofrece numerosas ventajas tales como el de ser un organismo haploide, de fácil obtención, factible de manipularse genéticamente, de fácil incorporación de isótopos para marcaje de micelio y de la posible utilización de auxótrofos. Se ha encontrado que en N. crassa en fase exponencial de crecimiento, la actividad específica<sup>1</sup> de la enzima glutamino sintetasa, varía de acuerdo a la fuente de nitrógeno en la que el hongo se crece ( 43 ).

<sup>1</sup> Se define actividad específica como la actividad de la enzima glutamino sintetasa por miligramo de proteína total.

En el presente trabajo se analizó si el aumento relativo en actividad específica de la enzima glutamino sintetasa del hongo N. crassa durante la fase exponencial de crecimiento en diversas condiciones nitrogenadas, es debido a activación o a inhibición de la enzima o bien a cambios en la concentración de la misma. Se encontró que las diferencias en actividad específica de la glutamino sintetasa se correlacionan con cambios en su concentración. Utilizando anticuerpos específicos contra la glutamino sintetasa pura de N. crassa se desarrolló un método sensible para medir velocidades relativas de síntesis y de degradación de la enzima. Los datos encontrados en este estudio indican que las diferencias en actividad específica de la enzima glutamino sintetasa del hongo N. crassa creciendo exponencialmente en diferentes condiciones nitrogenadas, se deben a diferencias en las velocidades relativas de síntesis de la enzima.

## MATERIAL Y METODOS

Cepas y Condiciones de Crecimiento. Las cepas de N. crassa usadas fueron: cepa 74 A silvestre y un auxótrofo de leucina, leu<sup>-</sup> A (FGSC 1124), obtenidas del Fungal Genetics Stock Center. El micelio se obtuvo a partir de un inóculo de conidias ( 44 ) en medio mínimo de Vogel N ( 45 ) enriquecido con sacarosa al 1.5%. En algunos experimentos el nitrato de amonio presente en el medio mínimo, fue sustituido ya sea por glutamato 5 mM o glutamina 5 mM. La incubación fue hecha a 25 °C con burbujeo constante con aire hidratado. Todos estos experimentos fueron hechos durante la fase logarítmica de crecimiento.

Preparación de Extractos y Medición de la Actividad de Glutamino Sintetasa. El micelio fue filtrado a través de papel Whatman no. 41 y lavado con agua desionizada, se hicieron polvos del micelio utilizando acetona y estos se molieron con hielo seco y se homogeneizaron a 4 °C, ya sea en solución amortiguadora A ( 50 mM imidazol, 50 mM glutámico, 80 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 25 mM de bisulfito de sodio, pH 7.2 ) o bien en solución amortiguadora B ( 5 mM fosfato de potasio, 50 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA pH 7.2 ) según se especifique en cada experimento. El homogenado se centrifugó 15 minutos a 12500 xg y el sobrenadante fue usado para medir actividad de la enzima así como incorporación de isótopos. La glutamino sintetasa fue

medida por actividad tanto de sintetasa como de transferasa, como ha sido descrito por Ferguson y Sims ( 46 ). La proteína fue determinada por el método de Lowry y col. ( 47 ).

Purificación de Glutamino Sintetasa. Todos los pasos realizados en la purificación fueron hechos a 4°C. A partir de 12 g de polvos del micelio secados con acetona, se hizo un extracto como antes se describió. La muestra se colocó sobre una columna de DEAE celulosa (2.5 x 20 cm) equilibrada en solución amortiguadora B. La columna se lavó con 50 ml de la misma solución B y la actividad de la enzima se eluyó con 400 ml de un gradiente lineal de 0 a 0.4 M de cloruro de sodio en solución amortiguadora B. Las fracciones con actividad de enzima se mezclaron y precipitaron con sulfato de amonio cristalino al 70%, agitando durante 15 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 15000 xg por 15 minutos; el precipitado resultante se resuspendió en 10 ml de solución amortiguadora B y se dializó toda la noche contra la misma solución. La muestra se procesó por cromatografía en una columna de sefarosa acoplada a ácido antranílico (1.5 x 20 cm) y la actividad de la enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 40 mM de AMP. ( 48 ). Las fracciones con actividad enzimática, se precipitaron con sulfato de amonio al 70% de saturación y se centrifugaron, la muestra se resuspendió en 1 ó 2 ml de solución amortiguadora B. La muestra así tratada se dializó contra la misma solución B y se almacenó a - 70 °C (48).

Preparación y Caracterización de Anticuerpos. Para preparar anticuerpos anti-glutamino sintetasa, se inyectaron conejos New Zeland entre 2 y 3 Kg de peso, con 250 µg de glutamino sintetasa pura de N. crassa en adjuvante completo de Freund. Los animales fueron reinoculados 2 veces a intervalos de 15 días cada vez, con la misma dosis de glutamino sintetasa. Una semana después de la segunda inyección, los conejos se sangraron por la vena marginal de la oreja cada semana por espacio de aproximadamente 3 meses. El suero obtenido de los diferentes sangrados se mezcló y la fracción total de gamma globulina se separó por tres precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio al 40% de saturación. El precipitado final se disolvió en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2, se dializó contra la misma solución amortiguadora y se congeló a - 70 °C. El anticuerpo anti-ovoalbúmina fue preparado de la misma manera, usando como dosis inmunizante 1 mg de ovoalbúmina. Para preparar gamma globulina anti-conejo, se inyectaron cabras por vía intramuscular tres veces con 1 mg cada vez de gamma globulina normal de conejo pura, en adjuvante completo de Freund, con intervalos de 15 días. Una semana después de la última inyección, las cabras fueron sangradas por la arteria carótida y el suero fue procesado como se mencionó anteriormente para preparar la fracción de gamma globulina.

Purificación de Anti-Glutamino Sintetasa por Cromatografía de Afinidad. La glutamino sintetasa pura de N. crassa se acopló a Sefarosa 4 B (Pharmacia Fine Chemicals) con CNBr (Axen y col. 49 ). La resina se

equilibró con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 y se incubó con la fracción de gamma globulina anti-glutamino sintetasa por 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó exhaustivamente con la misma solución amortiguadora y el anticuerpo se eluyó con NaSCN 3.0 M. La fracción eluida se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 y se congeló a - 70°C.

Los experimentos de doble inmunodifusión e inmunoelectroforesis se hicieron de acuerdo al método de Campbell y col. ( 50 ) usando solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2.

#### Titulación de la Actividad de Glutamino Sintetasa con Anticuerpos.

Enzima pura o extractos crudos de N. crassa conteniendo una cantidad constante de enzima, se incubaron con diferentes concentraciones de una fracción total de gamma globulina anti-glutamino sintetasa. La incubación se hizo a 4°C por 90 minutos en solución amortiguadora B, conteniendo 2 mg de albúmina sérica bovina por ml. El volúmen final de la reacción fue de 0.5 ml. Después de la incubación la glutamino sintetasa fue medida por actividad de transferasa en una alícuota del sobrenadante obtenido al centrifugar la mezcla de reacción a 7000 xg por 5 minutos.

Sedimentación en Gradientes de Sacarosa. La muestra en un volúmen final de 200  $\mu$ l, se colocó sobre un gradiente continuo de sacarosa del 5 al 20% en solución amortiguadora B y se centrifugó a 4 °C durante 12 hr a 40 000 rpm ( $w^2t$  de 74 000  $\text{rad}^2 / \text{seg}$ ) en el rotor SW 40 de la ultracentrífuga Beckman. Después de la centrifugación, las fracciones se colectaron a partir de la parte superior del tubo y la actividad de glutamino sintetasa



(sintetasa y transferasa) se determinó en cada fracción. Como marcadores se utilizaron proteínas globulares de coeficiente de sedimentación y peso molecular conocidos ( 48 ).

Iodinación de la Glutamino Sintetasa Pura de *N. crassa*. Glutamino sintetasa pura ( 1 mg ) fue incubada en presencia de 1 mCi de  $KI^{125}$  (New England Nuclear), 100  $\mu$ g de lactoperoxidasa (Calbiochem) y 30  $\mu$ M de  $H_2O_2$  en un volúmen final de 1.0 ml. Después de 15 min a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue cromatografiada sobre Sefadex G-25 (1.5 x 20 cm). Las fracciones conteniendo proteína radioactiva, fueron mezcladas y almacenadas a  $-70^\circ C$ . La radioactividad específica de la enzima fue de  $2 \times 10^7$  cpm por miligramo de proteína. Esta preparación fue usada como marcador de glutamino sintetasa en experimentos de electroforesis en gel de acrilamida.

Inmunoprecipitación de Glutamino Sintetasa marcada in vivo. Todas las manipulaciones se hicieron a  $4^\circ C$ . Los extractos de *N. crassa* marcados in vivo con diferentes isótopos se mezclaron y diluyeron a 0.8 ml con solución amortiguadora A, conteniendo 4 mg por mililitro de albúmina sérica bovina. La mezcla se centrifugó 60 min a 40 000 rpm en la centrifuga Beckman rotor tipo 65. El sobrenadante se incubó 90 min en presencia de 50  $\mu$ g de anticuerpo anti-glutamino sintetasa puro. Después de la incubación se añadió gamma globulina de cabra anti-gamma globulina de conejo ( 12 mg ) y la mezcla se colocó inmediatamente sobre tubos de centrifuga que contenían 4 ml de sacarosa al 20% ( en solución amortiguadora

A con 1 mg/ml de albúmina sérica bovina) y se centrifugó 60 min a 20 000 rpm en la centrifuga Beckman rotor SW 50.1. Después de la centrifugación, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente y los precipitados se procesaron para someterlos a electroforesis en gel de acrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio. Este procedimiento da menos atrapamiento inespecífico que aquellos métodos basados en centrifugación a baja velocidad después de formar el inmunoprecipitado. En esta nueva técnica, la segunda reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo durante la centrifugación, así el precipitado que se forma es apenas lo necesariamente grande para sedimentar a través de la sacarosa y por lo tanto la posibilidad de formación de agregados muy grandes se reduce.

Para ver la incorporación de aminoácidos marcados en la proteína total, se tomaron alícuotas de la mezcla original de los extractos y se precipitaron con ácido tricloroacético.

Electroforesis en Gel de Acrilamida. Los inmunoprecipitados o bien el precipitado con ácido tricloroacético proveniente de proteínas totales se disolvieron en 40 µl de una solución que contenía lauril sulfato de sodio, ditiotreitol, Tris, glicerol y azul de bromofenol ( 51 ). Las muestras se hirvieron por dos minutos en baño María quedando listas para colocarse en gel de acrilamida al 5% en presencia de lauril sulfato de sodio y solución amortiguadora de tris-glicina ( 52 ).

Después de la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.06% en metanol al 30% y ácido acético 10% durante 2 hr

a 45°C ( 56 ); se destañaron con calor en presencia de ácido acético al 7%.

Fluorografía. El gel una vez destañado, se sumergió durante 30 min en una solución concentrada de dimetil sulfóxido, después se transfirió por otros 30 min a una nueva solución de dimetil sulfóxido también concentrada. A continuación se cambió a una solución de dimetil sulfóxido y PPO al 22% durante 3 hr; finalmente el gel se colocó en 20 volúmenes de agua por espacio de 60 min. El gel se secó al vacío durante un período de 4 a 8 hr y se puso en contacto con una placa sensible a rayos X, marca Kodak ( todas estas manipulaciones se hicieron al abrigo de la luz ) y se congeló a -70°C de 3 a 5 días. (54). Al final de este tiempo la placa se reveló. Después de la fluorografía los geles se cortaron en fragmentos de 0.4 cm, se rehidrataron y se colocaron en viales de vidrio, digiriéndolos con peróxido de hidrógeno por 30 min a 150°C y 20 libras de presión. Las muestras se contaron en presencia de solución de centelleo de Bray. Se utilizó un espectrofotómetro de centelleo líquido Packard TRI-CARB modelo 3390 equipado con un analizador de actividad absoluta 544.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En N. crassa la actividad específica<sup>1</sup> de la glutamino sintetasa depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. Así en glutámico como única fuente de nitrógeno, la actividad específica de la enzima es aproximadamente 10 veces mayor que cuando se crece en presencia de glutamina y 4 veces mayor en relación al crecimiento en amonio ( 43 ).

Con el objeto de saber si este cambio en actividad específica se debe a cambios en activación o inhibición de la enzima o bien a cambios en su concentración, se siguieron varios enfoques. Dado que existen en la literatura antecedentes en C. utilis, crecida en diferentes condiciones nitrogenadas, de que cambios en la actividad de glutamino sintetasa van acompañados de cambios en la relación de actividades sintetasa/trans-ferasa, así como cambios en la estructura oligomérica de la enzima - ( 55 ), se procedió a analizar dichas relaciones de actividades y estructura oligomérica en la glutamino sintetasa de N. crassa en diferentes fuentes de nitrógeno. Usando como fuente de nitrógeno glutámico o glutamina, se crecieron simultáneamente cultivos del hongo en fase exponencial. A las 12 hr los micelios se cosecharon, se hicieron extractos (material y métodos) y se determinaron actividades de sintetasa y de transferasa. En glutámico y en glutamina se encontró, como se muestra en la figura 1. A y B, que la relación de actividades sintetasa / transferasa es la misma. Se tomaron alícuotas de estos extractos para determinar la

estructura oligomérica de la enzima, para lo cual las muestras se colocaron sobre gradientes de sacarosa del 5 al 20% y se centrifugaron; en cada una de las fracciones colectadas se midieron actividades tanto de sintetasa como de transferasa y se encontró que en ambas condiciones nitrogenadas, la enzima migra con un coeficiente de sedimentación de 14.95 correspondiendo a un peso molecular de 385 000 daltones (estructura octamérica), en base a cálculos ya reportados (48) y asumiendo que a lo largo de la centrifugación la muestra se comportó conformacionalmente igual que las proteínas globulares utilizadas como controles ( ver referencia 48 ).

En la figura 2, se muestra que tanto en glutámico como en glutamina la actividad enzimática (sintetasa y transferasa), se localiza en la región que corresponde a una estructura octamérica, notando además un desplazamiento hacia la zona de menor peso molecular del extracto proveniente del cultivo en glutamina, pudiendo deberse ésto a mayor inestabilidad de la enzima.

Para determinar la actividad enzimática por molécula mediante métodos inmunológicos, se procedió a caracterizar la fracción de gamma globulina obtenida al inmunizar conejos con glutamino sintetasa pura (Material y Métodos). En extractos crudos y en la enzima pura de N. crassa, se hicieron reacciones de doble inmunodifusión y de inmunoelectroforesis, encontrando una sola banda de precipitación en ambos casos (figura 3 A y B respectivamente). Cuando se usa como control

anticuerpo anti-ovoalbúmina no se aprecia ninguna banda de precipitación, como se muestra en la figura 3 C. Con esta fracción de anticuerpos anti-glutamino sintetasa de N. crassa, se tituló la actividad de la enzima (Material y Métodos); la cantidad de anticuerpo necesaria para precipitar-inactivar la mitad de la actividad inicial de la enzima que se usó en el ensayo, se tomó como índice para comparar la actividad por molécula en las diferentes condiciones. El cociente resultante de esta relación es similar tanto en glutámico como en glutamina: 154 y 173 respectivamente, indicando que la actividad por molécula es la misma en ambas condiciones nitrogenadas (figura 4).

En base a estos resultados, podemos concluir que las diferencias en actividad específica encontradas en diferentes condiciones nitrogenadas, es debida a cambios en la concentración de enzima.

De estos datos surge una pregunta interesante: estos cambios en concentración ¿son debidos a cambios en la velocidad de síntesis o a cambios en la velocidad de degradación?. Para estudiar los papeles que desempeñan tanto la síntesis como la degradación de la enzima en la regulación de la concentración de enzima, se desarrolló una metodología para cuantificar la incorporación de isótopos en la glutamino sintetasa de N. crassa (ver Material y Métodos).

Estos estudios dependen básicamente de la especificidad de la inmunoprecipitación de la enzima. La fracción de anticuerpo usado en todos los experimentos da únicamente una banda de precipitación en base a los criterios de doble inmunodifusión e inmunoelectroforesis ya descritos.

Para el procedimiento de inmunoprecipitación, se desarrolló un método para disminuir el atrapamiento inespecífico de proteínas marcadas radioactivamente, el cual disminuye las posibilidades de formación de inmunoprecipitados grandes que arrastren material no específico durante la separación diferencial, debido a que el anti-anticuerpo empleado se pone a reaccionar sobre el colchón de sacarosa y los complejos antígeno-anticuerpo secundario se forman a lo largo de la centrifugación que se hace para separar el inmunoprecipitado (Material y Métodos).

En cultivos de N. crassa creciendo en diferentes fuentes de nitrógeno, se midieron las velocidades relativas de síntesis y de degradación, por un procedimiento basado en doble incorporación de isótopos.

En la literatura existen reportados diferentes métodos para medir síntesis y degradación ( 56 - 59 ), cada uno de los cuales - implica una serie de suposiciones y limitaciones que ya han sido descritos y discutidos ampliamente ( 60 ). La suposición más importante en el método que hemos empleado para medir síntesis relativa (pulso corto con aminoácido radioactivo), es que todas las proteínas sean sintetizadas de la misma poza de aminoácidos; suposición que no resulta ilógica para proteínas sintetizadas sobre ribosomas citoplásmicos, tal como la glutamino sintetasa que nos ocupa. Otro punto de precaución es que la vida media de la enzima así como la de las -

proteínas totales sea mayor que el tiempo transcurrido entre la administración del isótopo y el aislamiento de la proteína ( 60 ). Para descartar esta posibilidad se hicieron experimentos que serán - descritos más adelante.

El método utilizado para medir degradación relativa en el presente trabajo, está basado en la administración de un aminoácido radioactivo en el medio de cultivo por un tiempo corto, después del cual el medio es reemplazado por medio con un exceso del mismo aminoácido no-radioactivo y la incubación del cultivo se continúa. El decremento en radioactividad específica ( o radioactividad total si el sistema no está en estado estacionario ) de la enzima aislada es una medida de la velocidad de degradación. Las suposiciones hechas en este procedimiento son: A) la radioactividad de la muestra de proteína usada es - representativa de toda la proteína presente en la muestra aislada, más que un contaminante, por lo que se debe estar seguro de la pureza absoluta de las muestras utilizadas; B) que no exista reutilización del isótopo. El decaimiento de un isótopo en una proteína no es función únicamente de la velocidad a la cual la proteína marcada es degradada a los aminoácidos que la constituyen, sino que también es función de la velocidad a la que el isótopo reentra a la poza de aminoácidos a partir de la cual la proteína es sintetizada ( 61 - 63 ); la reutilización de los isótopos es una de las principales limitaciones para obtener datos fidedignos de -



velocidades de síntesis y de degradación. De acuerdo a este problema, a lo largo de los experimentos realizados en el presente trabajo se ha utilizado leucina como aminoácido radioactivo debido a que es, junto con la lisina, de los aminoácidos que no son metabolizados a otros aminoácidos (por lo menos ésto sucede en mamíferos) y que por lo tanto se reutilizan menos ( 64, 65 ). Más aún, en experimentos de degradación se usó un auxótrofo de leucina.

La especificidad de la metodología seguida en el presente estudio se demuestra en el experimento presentado en la figura 5. A N. crassa creciendo exponencialmente en glutámico como única fuente de nitrógeno en cultivos simultáneos, se le administró un pulso de 60 min ya sea con leucina  $[C^{14}]$  o leucina  $[H^3]$ . Se hicieron extractos de ambos cultivos y se mezclaron tomando alícuotas para determinar proteínas totales por precipitación con ácido tricloroacético y glutamino sintetasa por el método de inmunoprecipitación específica. Las muestras se procesaron (Material y Métodos) para electroforesis en gel de acrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio, posteriormente el gel fue teñido con azul de Coomassie y tratado por el método de fluorografía.

Después del tratamiento de fluorografía, los geles se cortaron en fragmentos de 0.4 cm y la radioactividad ( $C^{14}$  y  $H^3$ ) contada en cada fragmento. Como se muestra en la figura 5 A, la muestra de proteínas totales contiene un gran número de bandas que son visibles tanto por tinción como por proteína marcada radioactivamente y detectada por

fluorograffa. Como se aprecia en esta misma figura, la radioactividad en  $C^{14}$  y en  $H^3$  coincide a lo largo del gel. Para obtener la relación de  $H^3/C^{14}$  en las proteínas totales, la radioactividad de  $H^3$  en cada fragmento del gel fue sumada y dividida entre la suma de la radioactividad como  $C^{14}$ . La figura 5 B, muestra el patrón electroforético del inmunoprecipitado específico. Por tinción con azul de Coomassie, el inmunoprecipitado contiene 4 polipéptidos, los cuales migran en la misma posición que por peso molecular corresponden a albúmina ( A ), cadena pesada de gamma globulina ( H ), glutamino sintetasa de N. crassa ( GS ), de acuerdo a la migración de la glutamino sintetasa iodinada in vitro mostrada en la figura 5 C y la cadena ligera de gamma globulina ( L ), respectivamente. La albúmina, se explica su presencia en los geles, por el hecho de que está presente en los gradientes de sacarosa usados para separar los inmunoprecipitados que después son sometidos a electroforesis en geles de acrilamida (Material y Métodos), por otro lado el material teñido que migra más lento que la albúmina parece ser un artefacto de este gel en particular, ya que no aparece en otros experimentos ( ver figuras 6 y 7 ). El patrón de fluorograffa de este gel indica que corresponde a la glutamino sintetasa de N. crassa. El patrón de radioactividad de ambos  $H^3$  y  $C^{14}$ , muestra un pico que corresponde a glutamino sintetasa. Debido a que existen trazas de radioactividad en otras regiones del gel, la relación de  $H^3/C^{14}$  que corresponde a la enzima fue obtenida de la fracción del gel que corresponde únicamente al pico. Como era de esperarse en este experimento control, la relación de  $H^3/C^{14}$  en la enzima glutamino sintetasa del hongo N. crassa -

es la misma que la relación encontrada en proteínas totales, lo cual nos está indicando que todas las proteínas marcadas en N. crassa tienen la misma relación de incorporación tanto de  $H^3$  como de  $C^{14}$ .

En las figuras 6 y 7, se muestran los resultados de los experimentos hechos para medir la síntesis relativa de la enzima glutamino sintetasa entre cultivos creciendo en glutámico y glutamina o en glutámico y amonio, respectivamente. El cultivo creciendo en glutámico recibió un pulso de 30 min con leucina [ $C^{14}$ ], mientras que el cultivo creciendo en la otra fuente nitrogenada ( glutamina o amonio ), recibió un pulso de 30 min con leucina [ $H^3$ ]. Los extractos se mezclaron y procesaron para determinar la relación  $H^3 / C^{14}$  tanto en proteína total como en glutamino sintetasa. La relación de marcas de isótopos en glutamino sintetasa dividida entre la relación en proteínas totales, cuantifica la velocidad relativa de síntesis de la glutamino sintetasa entre las dos condiciones de crecimiento. La relación  $H^3 / C^{14}$  en glutamino sintetasa es aproximadamente 12 veces más baja que la encontrada en proteínas totales en el experimento de la figura 6 y aproximadamente 3 veces más baja en el experimento de la figura 7. Los datos obtenidos en estos experimentos indican diferencias en la velocidad relativa de síntesis en cultivos creciendo exponencialmente en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno y pueden explicar las diferencias encontradas en actividad específica de la enzima.

Como se había mencionado anteriormente, cuando se está midiendo síntesis de proteínas específicas, es importante demostrar que la vida media de la enzima es larga en relación al tiempo que dure el pulso radioactivo ( 60 ). Para ésto se diseñaron experimentos con el objeto de determinar la degradación de la glutamino sintetasa de N. crassa en diferentes condiciones nitrogenadas de cultivo. Estos experimentos están basados en la desaparición de la radioactividad incorporada en proteínas totales y en glutamino sintetasa. Para poder seguir adecuadamente esta desaparición de leucina radioactiva, se usó una cepa auxótrofa de leucina (Material y Métodos). Este auxótrofo presenta la misma actividad específica de la glutamino sintetasa que la cepa silvestre cuando se crece en las diversas fuentes de nitrógeno empleadas en este estudio.

Para medir la velocidad de degradación relativa de la proteína total, se le dió al cultivo un pulso de 60 min con leucina radioactiva, el micelio se lavó y se pasó a medio fresco conteniendo un exceso de leucina no radioactiva. Para medir radioactividad incorporada en proteínas totales, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se procesaron. En la figura 8, se presenta el experimento realizado creciendo a N. crassa en glutámico como fuente única de nitrógeno; como se puede ver en la figura 8 A, el hongo sigue creciendo exponencialmente después del lavado de medio y transpaso al medio no radioactivo. Después de este cambio de medios, la radioactividad específica en proteínas totales disminuye (figura 8, B). Por otro lado, la radioactividad total incorporada en pro-

teínas disminuye lentamente (figura 8, B). Esta disminución observada en el experimento es tan pequeña que hace difícil de calcular con certeza la vida media de la proteína total. Se obtuvieron resultados similares cuando el organismo se creció en glutamina o en amonio como fuentes nitrogenadas.

De acuerdo a la Tabla 1, se observa que la disminución en la radioactividad en proteínas totales varió de un 10 a un 20% en 4 hr. La velocidad de degradación de glutamino sintetasa en relación a proteínas totales, se midió como sigue: se crecieron simultáneamente cultivos de N. crassa, en la misma fuente de nitrógeno y se dió un pulso de 60 min ya sea con leucina ( $C^{14}$ ) o ( $H^3$ ); el micelio marcado con  $C^{14}$  se filtró, se hicieron polvos con acetona y se almacenaron a  $-70^{\circ}C$ , mientras que el micelio marcado con  $H^3$  se lavó y el cultivo se siguió creciendo 4 hr más en medio fresco conteniendo un exceso de leucina no radioactiva. El micelio de ambos cultivos se procesó para preparar extractos. Estos extractos se mezclaron y se tomaron alícuotas para medir la relación de radioactividad  $H^3 / C^{14}$  tanto en proteínas totales como en glutamino sintetasa, como se ha descrito en la figura 6. La relación de  $H^3 / C^{14}$  en proteínas totales dividida entre la relación en glutamino sintetasa nos da la velocidad relativa de degradación de la enzima. Como se muestra en la Tabla 1, la velocidad de degradación de la glutamino sintetasa es similar a la de proteínas totales variando entre valores de 0.85 en glutámico a 1.1 en amonio. De los datos obteni-

dos nos damos cuenta que no son lo suficientemente sensibles para determinar la vida media de proteínas totales ni de la enzima glutamino sintetasa, pero son útiles para concluir que: 1) no existen diferencias importantes en las velocidades relativas de degradación de la enzima glutamino sintetasa en las diferentes condiciones nitrogenadas estudiadas y 2) los pulsos de 30 min usados en los experimentos presentados en las figuras 6 y 7 son lo suficientemente cortos como para poder medir la síntesis de la enzima.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios de incorporación de isótopos se encuentran resumidos en la Tabla 2. Los datos se normalizaron con respecto a los valores obtenidos en cultivos de N. crassa que crecieron en glutámico como fuente única de nitrógeno. Las diferencias encontradas en actividad específica de la glutamino sintetasa en diversas condiciones nitrogenadas corresponden pues a diferencias en síntesis de la enzima.

Hemos traducido in vitro el RNA mensajero que codifica para la síntesis de la enzima glutamino sintetasa del hongo N. crassa (66).

Así, con las herramientas necesarias para medir síntesis y degradación relativas de la enzima, así como la cuantificación del RNA mensajero que codifica para la síntesis de la enzima glutamino sintetasa, junto con la obtención de mutantes estructurales y regulatorias de ésta enzima (67, 68) se pueden llevar a cabo experimentos enfocados hacia la determinación de los mecanismos que un eucariote sencillo, como N. crassa utiliza para controlar la cantidad de enzima que necesite en un momento dado.

## BIBLIOGRAFIA

1. Stadtman, E. R. y Ginsburg, A. (1974) en The Enzymes, ed. Boyer, P. D. (Academic Press, New York), vol. X pp.755-807
2. Meister, A. (1974) en The Enzymes, ed. Boyer, P. D. (Academic Press, New York), vol. X pp. 699-754
3. Rhee, S. G. y Chock, P. B. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 476-480
4. Mecke, D., y Holzer, H. (1966) Biochim. Biophys. Acta. 122, 341-351
5. Woolfolk, C.A., Shapiro, B.M. y Stadtman, E. R. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 116, 177-192
6. Wu, C. y Yuan, L.H. (1968) J. Gen. Microbiol. 51, 57-65
7. Kingdon, H.S., Hubbard, J. S. y Stadtman, E.R. (1968) Biochemistry 7, 2136-2142
8. Shapiro, B.M. y Ginsburg, A. (1968) Biochemistry 7, 2153-2167
9. Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 242, 5069.
10. Woolfolk, C.A. y Stadtman, E.R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 118, 736-755
11. Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3769-3771
12. Wulff, K, Mecke, D. y Holzer, H. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 740 - 745
13. Mecke, D., Wulff, K. y Holzer, H. (1966) Biochem. Biophys. Acta. 128. 559-567

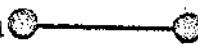
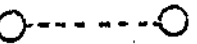
14. Shapiro, B.M. (1969) *Biochemistry*, 8, 659
15. Magasanick, B., Prival, M.J., Brenchley, J.E. Tyler, B.M., DeLeo, A.B., Streicher, S. L., Bender, R.A. y Paris. G.C. (1974) *Curr. Top. Cell. Regul.* 8, 119-138
16. Gancedo, C., Ebner, E., Schutt, F. y Mecker, D. (1968) Abstract, Meeting Eur. Biochem. Soc. Praha, 5th.
17. Ferguson, A.R. y Sims, A.P. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 80, 159-171
18. Hubbard, J.S. y Stadtman, E.R. (1967) *J. Bacteriol.* 93, 1045-1055
19. Deuel, T., Henning, S.B. y Ginsburg, A. Unpublished data.
20. Rubello, J.L. y Strauss, N. (1969) *J. Bacteriol.* 98, 683
21. Kohlaw, G., Dargert, A. y Holzer, H. (1965) *Biochemistry* 34, 224-238
22. Valentine, R.S., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1968) *Biochemistry* 7, 2143-2152
23. Wedler, F.C. y Hoffman, F.M. (1974) *Biochemistry* 13, 3215-3221
24. Tate, S.S. y Meister, A. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 781-785
25. Milman, G., Portnoff, L.S. y Tiemeier, D.C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1393-1399
26. Kulka, R. G. y Cohen, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6738-6743
27. Rudnick, D. y Waelsh, H. (1955) *J. Exp. Zool.* 129, 309-326
28. Piddington, R. y Moscona, A.A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* 14, 429-432



29. Moscona, A. A., Moscona, M. y Saenz, N. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61, 160-167
30. Sarkar, P.K. y Moscona, A.A. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2308-2311
31. Sarkar, P.K. y Moscona, A.A. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1667-1671
32. Sarkar, P.K. y Griffith, B. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 675-681
33. De Mars, R. (1958) Biochem. Biophys. Acta. 27, 435-436
34. Kirk, D.L. y Moscona, A.A. (1963) Develop. Biol. 8, 341-357
35. Paul, J. y Fottrell, P.F. (1963) Biochem. Biophys. Acta. 67, 334-336
36. Barnes, P.R., Youngborg, D. y Kito, P.D. (1971) J. Cell. Physiol. 77, 135
37. Stamatiadou, M.N. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 485-490
38. Tiemeier, D.C. y Milman, G. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5722-5727
39. Kulka, R.G., Tomkins, G.M. y Crook, R.B. (1972) J. Cell. Biol. 54, 175 - 178
40. Moscona, M., Frenkel, N. y Moscona, A.A. (1972) Develop. Biol. 28, 229-241
41. Wu, C. y Morris, H. P. (1970) Cancer. Res. 30, 2675
42. Chader, G.J. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1102-1105

43. Vichido, I., Quinto, C., Palacios, R. y Mora, J. Trabajo en preparación.
44. Sánchez, S., Martínez, L. y Mora, J. (1972) J. Bacteriol. 112, 276-284
45. Vogel, H. (1956) Microbiol. Genet. Bull. 13, 42-43
46. Ferguson, A.R. y Sims, A.P. (1974) J. Gen. Microbiol. 80, 173-185
47. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randell, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
48. Palacios, R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4787-4797
49. Axen, R., Porath, J. y Ermack, S. (1967) Nature 214, 1302-1304
50. Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1970) Methods in Immunology pp. 250-267. W.A. Benjamin, Inc. New York.
51. Palmiter, R.D., Oka, T. y Schimke, R.T. (1971) J. Biol. Chem. 246, 724-737
52. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
53. Martin, A.F., Prior, G. y Zak, R. (1976) Anal. Biochem. 72, 577-585
54. Bonner, W.M. y Laskey, R.A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88
55. Sims, A.P., Toone, J. y Box, V. (1974) J. Gen. Microbiol. 80, 485-499
56. Schimke, R.T. y Doyle, D. (1970) Annu. Rev. Biochem. 39, 929-976

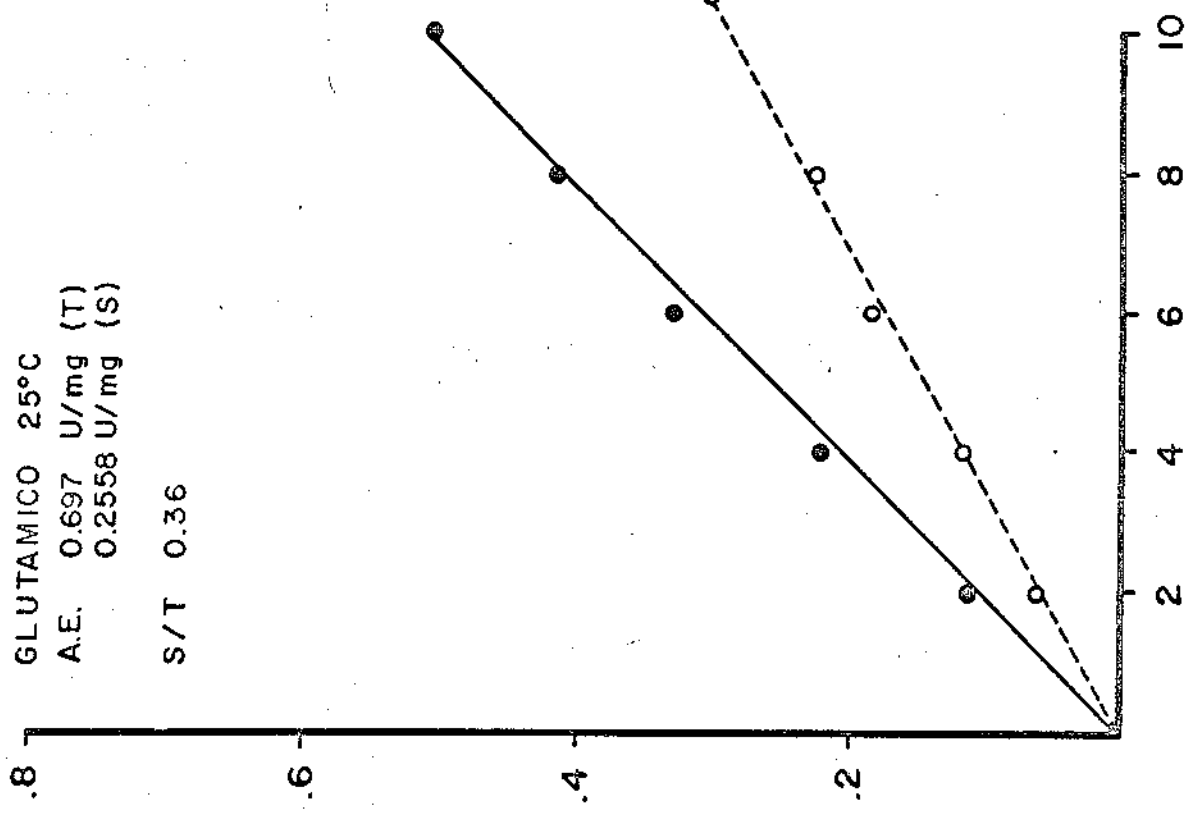
57. Kenney, F.T. en "Mammalian Protein Metabolism" (H.N. Munro, ed.) Vol. 4, pp. 131. Academic Press, New York, 1970
58. Schimke, R.T. (1969) Curr. Top. Cell. Regul. 1, 77
59. Recheigl, M. (1971) "Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems" University Park Press, Baltimore, Maryland.
60. Schimke, R.T. (1975) Methods Enzymol. 40, 241-266
61. Reiner, J.M. (1953) Arch. Biochem. 46, 80
62. Buchanan, D.L. (1961) Arch. Biochem. 94, 489
63. Koch, A.L. (1962) J. Theoret. Biol. 3, 283-303
64. Schimke, R. T. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3808-3817
65. Arias, M.I., Doyle, D., y Schimke, R.T. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3303
66. Palacios, R., Campomanes, M. y Quinto, C. (1977) J. Biol. Chem. En Prensa.
67. Sánchez, F.E., Dávila, G., Mora, J. y Palacios, R. Manuscrito en preparación.
68. Dávila, G., Sánchez, F.E., Palacios, R. y Mora, J. Trabajo en preparación.

Figura 1. Ensayo de actividad de la enzima glutamino sintetasa en extractos de cultivos de N. crassa creciendo en glutámico y en glutamina como fuente única de nitrógeno. Ensayos de transferasa  y de sintetasa  se incubaron como se describe en Material y Métodos, en presencia de 137 µg de proteína del extracto crudo del cultivo crecido en glutámico ( A ) y 1680 µg de proteína del cultivo crecido en glutamina ( B ). A diferentes tiempos la reacción fué detenida, como se indica y la densidad óptica a 500 nm fue medida. La relación sintetasa / transferasa fue obtenida de la pendiente en las regiones lineales de las curvas.

C E P A 7 7 A

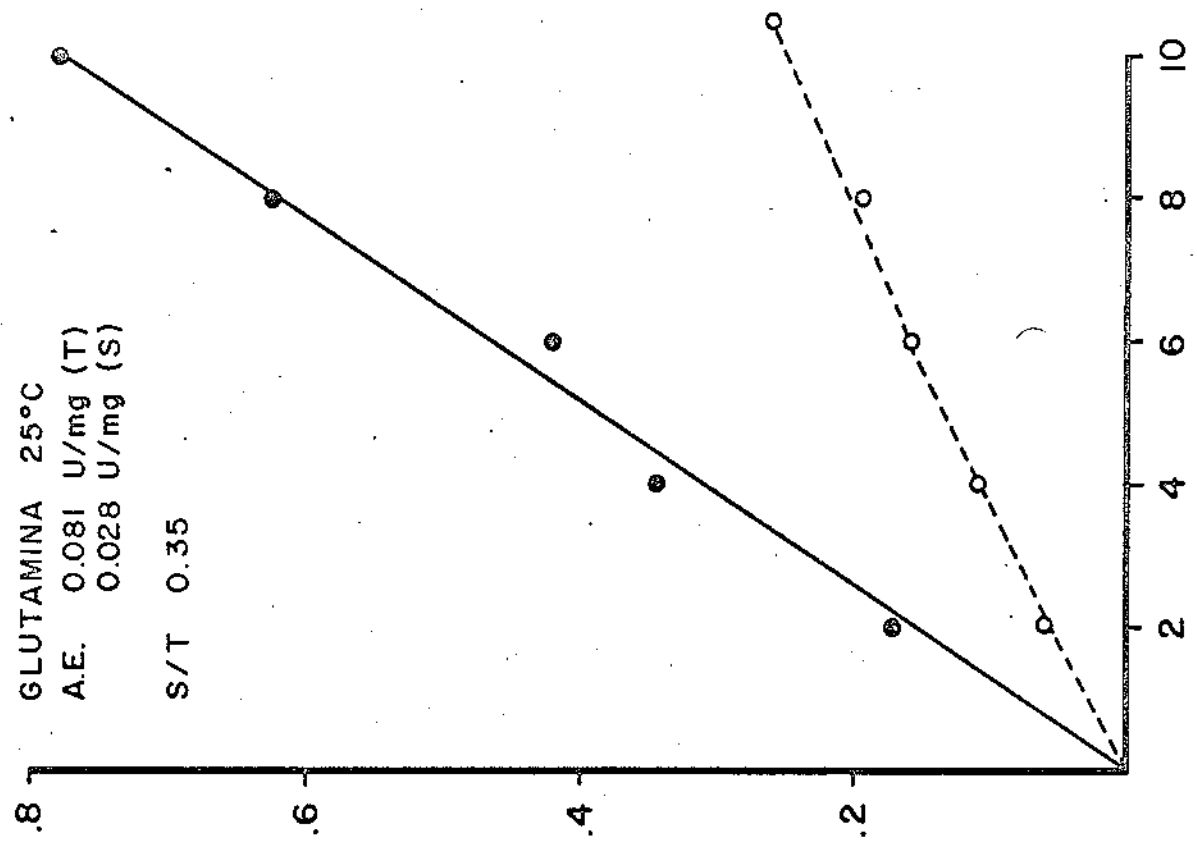
A

GLUTAMICO 25°C  
A.E. 0.697 U/mg (T)  
0.2558 U/mg (S)  
S/T 0.36



B

GLUTAMINA 25°C  
A.E. 0.081 U/mg (T)  
0.028 U/mg (S)  
S/T 0.35



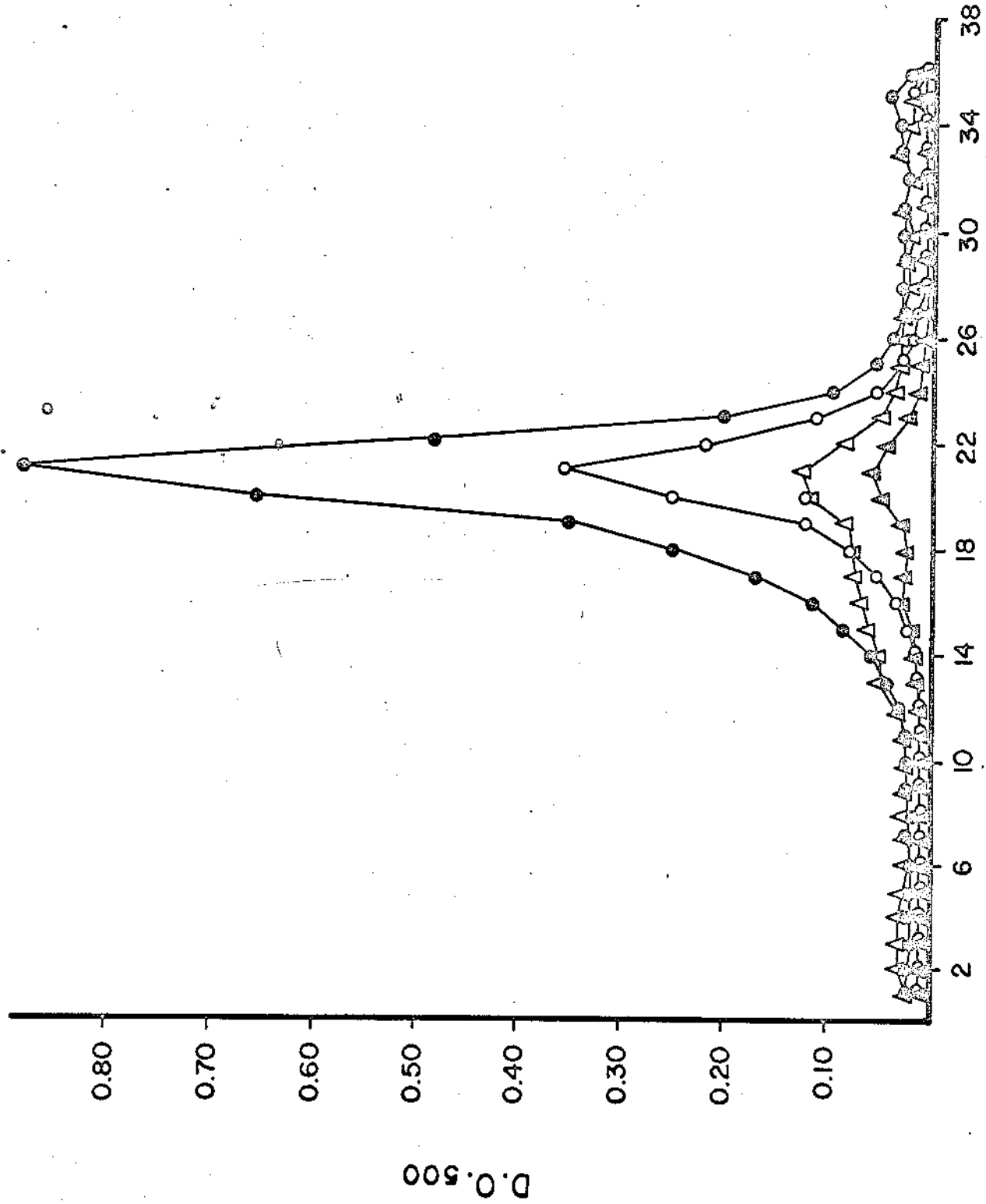
D. O. 500 = E

tiempo ( min )

FIG. 1

Figura 2. Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos crudos de N. crassa crecidos en glutámico y en glutamina como fuentes únicas de nitrógeno. Extractos crudos de N. crassa crecidos en glutámico 5 mM o en glutamina 5 mM, fueron sedimentados a través de un gradiente de sacarosa, como se describe en Material y Métodos, utilizando 1.36 mg de proteína de cada extracto. Después de la centrifugación los gradientes fueron fraccionados y fue determinada la actividad de glutamino sintetasa en cada fracción, de cada uno de los extractos provenientes de cultivos en glutámico tanto por el ensayo de transferasa (●—●) como de sintetasa (○-----○), así como también de los extractos provenientes de cultivos crecidos en glutamina: transferasa △-----△ y sintetasa ▲——▲.

GRADIENTE DE SACAROSA: CEPAS 74A



fracción

FIG. 2

Figura 3. Doble inmunodifusión e inmunolectroforesis de glutamino sintetasa de N. crassa y anticuerpo específico.

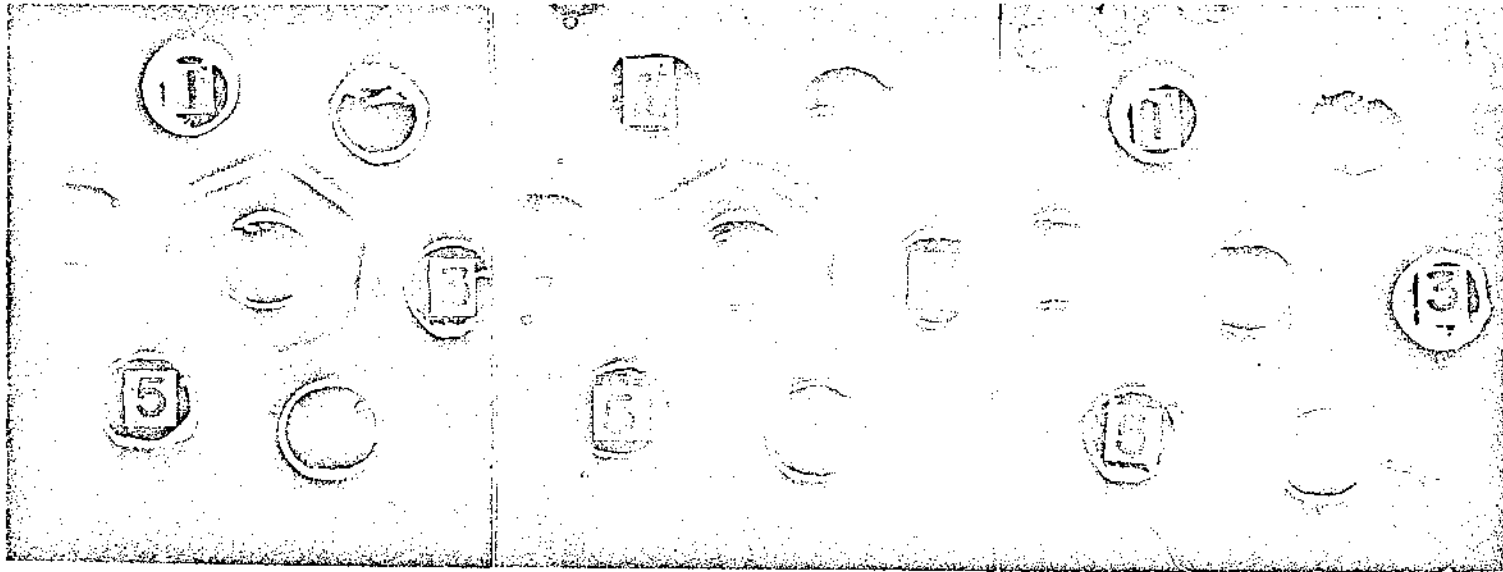
Arriba se muestra la doble inmunodifusión. A: fracción de gamma globulina anti-glutamino sintetasa a una concentración de 30 mg/ml (en el centro) y extracto crudo de N. crassa (1 al 6) a concentración de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.6 mg de proteína por ml respectivamente. B: fracción de gamma globulina anti-glutamino sintetasa a concentración de 30 mg por ml (centro) y glutamino sintetasa pura (1 al 6) a concentraciones de 600, 300, 150, 75, 37 y 10  $\mu$ g por ml respectivamente. C: fracción de gamma globulina anti-ovoalbúmina a concentración de 30 mg/ml (centro) y ya sea extracto crudo de N. crassa (1, 3 y 5) a concentraciones de 20, 5 y 1.25 mg de proteína respectivamente o bien glutamino sintetasa pura de N. crassa (2, 4 y 6) a concentraciones de 600, 150, y 37  $\mu$ g por ml. Abajo, se muestra la inmunolectroforesis. Los signos indican la posición de los electrodos. Centro: fracción de gamma globulina anti-glutamino sintetasa a concentración de 30 mg/ml; A, extracto crudo de N. crassa a concentración de 20 mg de proteína por ml; B, glutamino sintetasa pura de N. crassa a concentración de 600  $\mu$ g/ml.



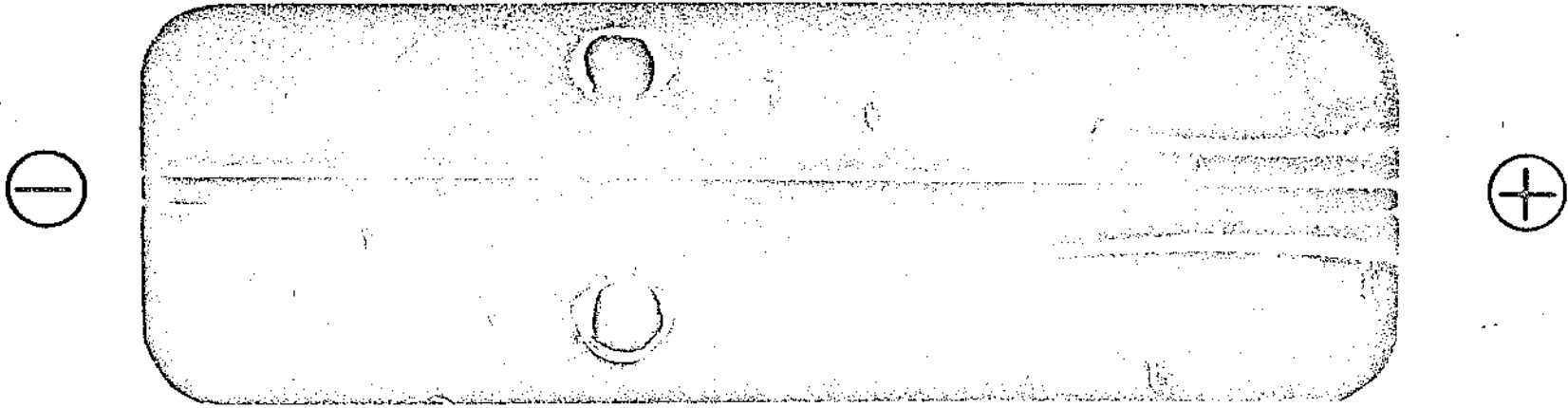
A

B

C



A

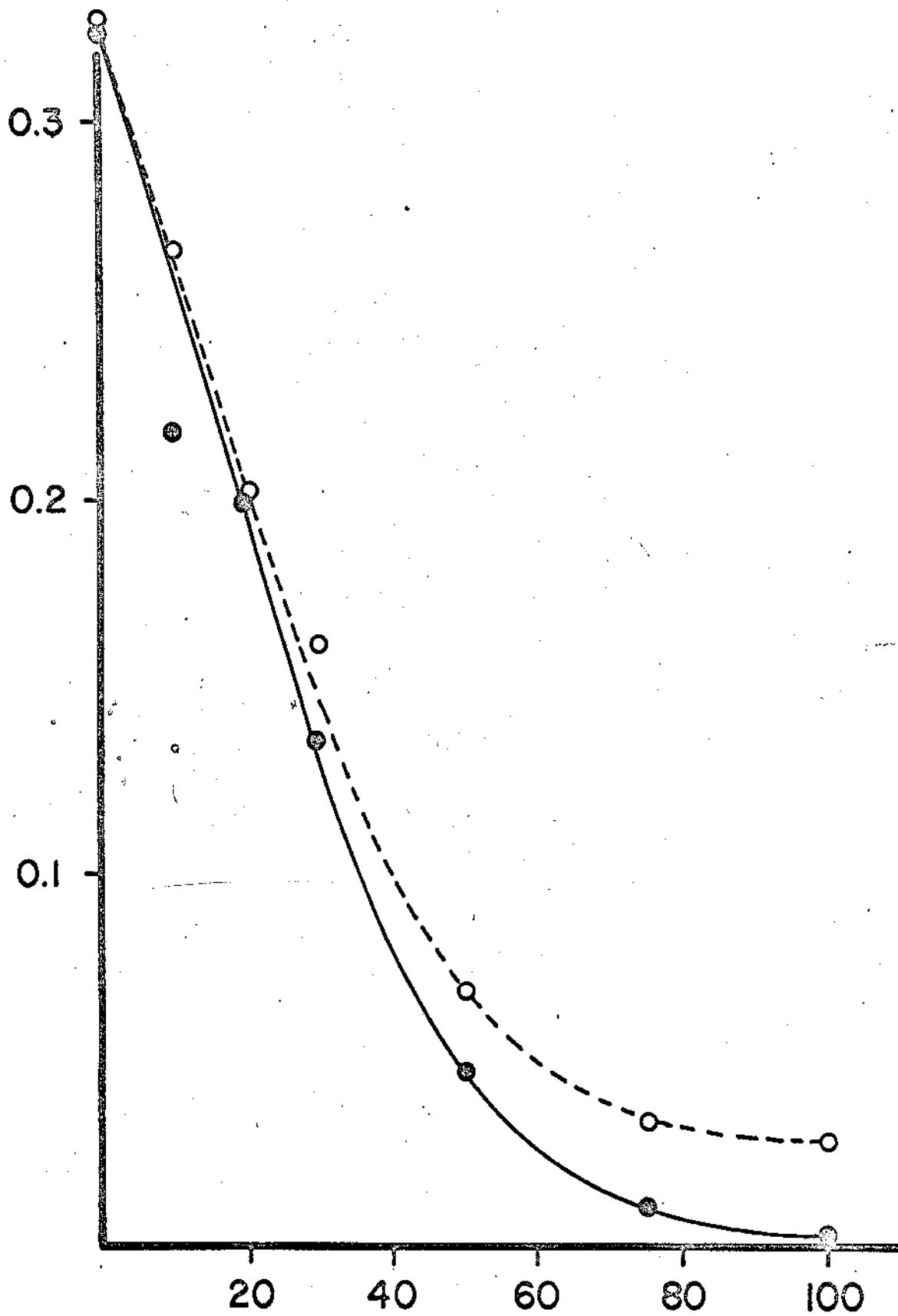


B

FIG. 3

Figura 4. Curvas de inactivación-precipitación de glutamino sintetasa de extractos de N. crassa provenientes de cultivos crecidos en glutámico o glutamina como fuente única de nitrógeno. Se incubó una cantidad constante de glutamino sintetasa (aproximadamente 0.3 unidades) ya sea de cultivo crecido en glutámico (●—●) o en glutamina(○---○) como fuente de nitrógeno, en presencia de concentraciones diferentes de una fracción de gamma globulina anti-glutamino sintetasa, como se describe en Material y Métodos. Después de la incubación la mezcla de reacción se centrifugó y se determinó la actividad de glutamino sintetasa en el sobrenadante.

unidades G.S. en sobrenadante



µl anticuerpo

FIG. 4

Figura 5. Aislamiento y cuantificación de proteína total y glutamino sintetasa de N. crassa marcada radioactivamente in vivo. N. crassa fue criada en 5 mM de glutámico como única fuente de nitrógeno (Material y Métodos). Después de 4 hr el cultivo fue dividido y marcado durante 60 min ya sea con leucina  $[C^{14}]$  0.5  $\mu$ Ci/ml o leucina  $[H^3]$  5  $\mu$ Ci/ml. El micelio de ambos cultivos fue colectado y se prepararon extractos. Los extractos marcados con ambos isótopos se mezclaron y la proteína total así como la glutamino sintetasa fueron obtenidas por precipitación con ácido tricloroacético e inmunoprecipitación específica respectivamente (Material y Métodos). Las muestras precipitadas con ácido tricloroacético e inmunoprecipitadas fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio y fluorografía. Después de la fluorografía los geles fueron cortados en fragmentos de 0.4 cm, digeridos con peróxido de hidrógeno y contados para radioactividad en  $C^{14}$  y  $H^3$ . El proceso más detallado se da en Material y Métodos. En el cuadro A, se muestra la electroforesis de la muestra de proteína total;  $\bigcirc$ ----- $\bigcirc H^3$  y  $\bullet$ ----- $\bullet C^{14}$ . La relación  $H^3 / C^{14}$  fue medida como se describe en Material y Métodos.

Es también mostrado el gel después de teñirse con azul de Coomassie ( 1 ) y después de la fluorografía ( 2 ). Cuadro B, se presenta la electroforesis del inmunoprecipitado;  $\text{O} \text{---} \text{O} \text{H}^3$  y  $\bullet \text{---} \bullet \text{C}^{14}$ ; ( 1 ) el gel después de tinción con azul de Coomassie indicando con flechas las posiciones de albúmina ( A ), cadena pesada de gamma globulina ( H ), glutamino sintetasa de N. crassa ( GS ) y cadena ligera de gamma globulina ( L ); ( 2 ) el gel después de la fluorografía. Cuadro C, electroforesis de glutamino sintetasa de N. crassa purificada y marcada in vitro con  $\text{I}^{125}$ . Se muestra el gel después de fluorografía.

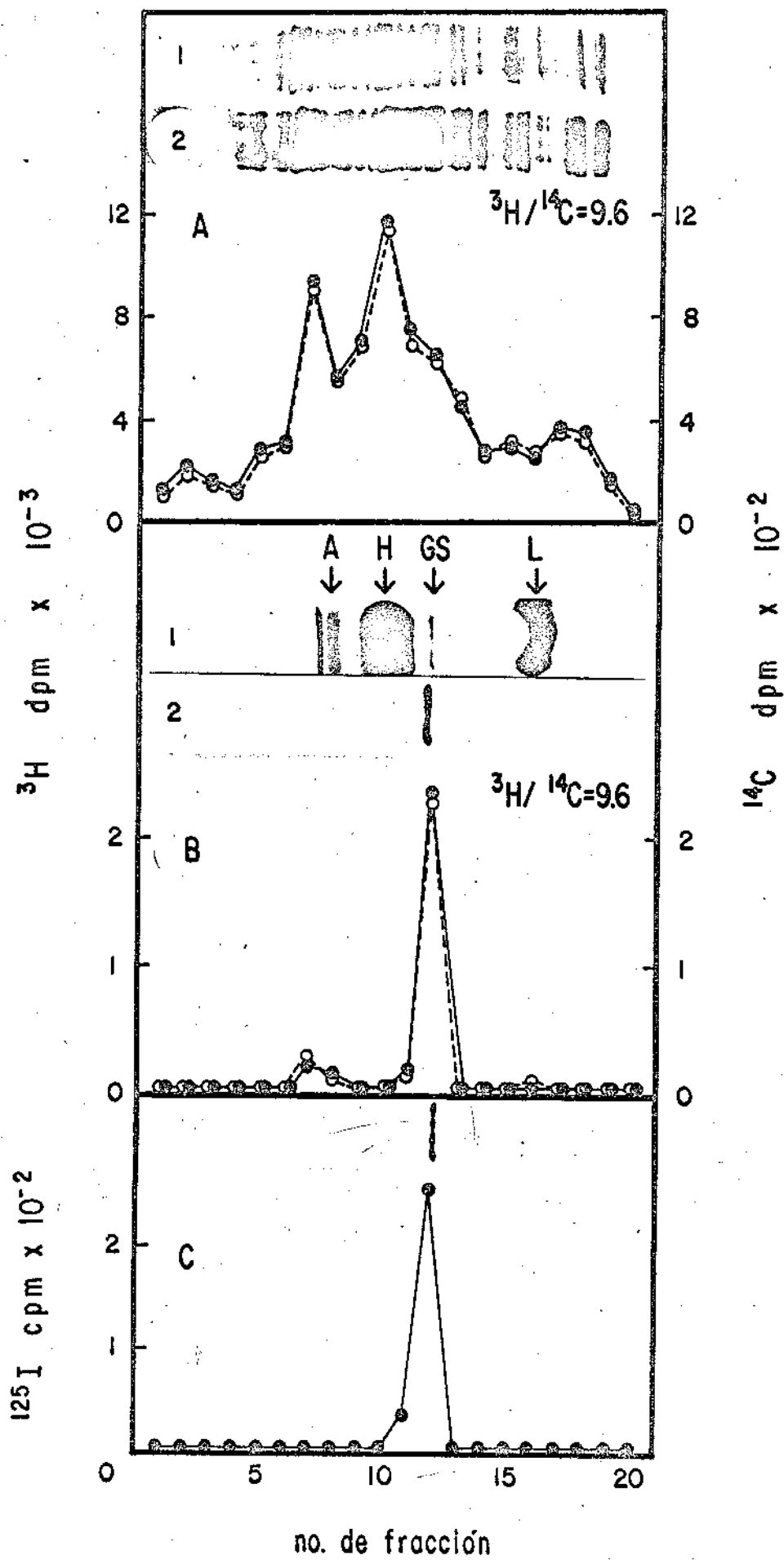


FIG. 5

Figura 6. Velocidad relativa de síntesis de la glutamino sintetasa de N. crassa crecida en glutámico o glutamina como fuente única de nitrógeno. Se crecieron cultivos paralelos de N. crassa ya sea en glutámico 5 mM o glutamina 5 mM como fuente única de nitrógeno. Después de 7.5 hr el cultivo creciendo en glutámico recibió un pulso de 30 min con leucina [ $C^{14}$ ], 0.5  $\mu$ Ci/ml mientras que el crecido en glutamina recibió un pulso de 30 min con leucina [ $H^3$ ], 10  $\mu$ Ci/ml. Se combinaron los extractos obtenidos de ambos cultivos y se procesaron como se describe en la leyenda de la figura 5, para cuantificar  $H^3$  y  $C^{14}$  en proteína total y en glutamino sintetasa. El cuadro A, muestra la electroforesis del inmunoprecipitado después de agregar 5  $\mu$ g de glutamino sintetasa no marcada radioactivamente de N. crassa; ○-----○  $H^3$ ; ●-----●  $C^{14}$ ; 1, el gel después de teñido con azul de Coomassie; 2, el gel después de fluorografía. Cuadro B, electroforesis del precipitado de proteínas totales; ○-----○  $H^3$ ; ●-----●  $C^{14}$ . Se muestra el gel después de fluorografía en el mismo cuadro. Las relaciones de  $H^3 / C^{14}$  fueron calculadas como en la figura 5.

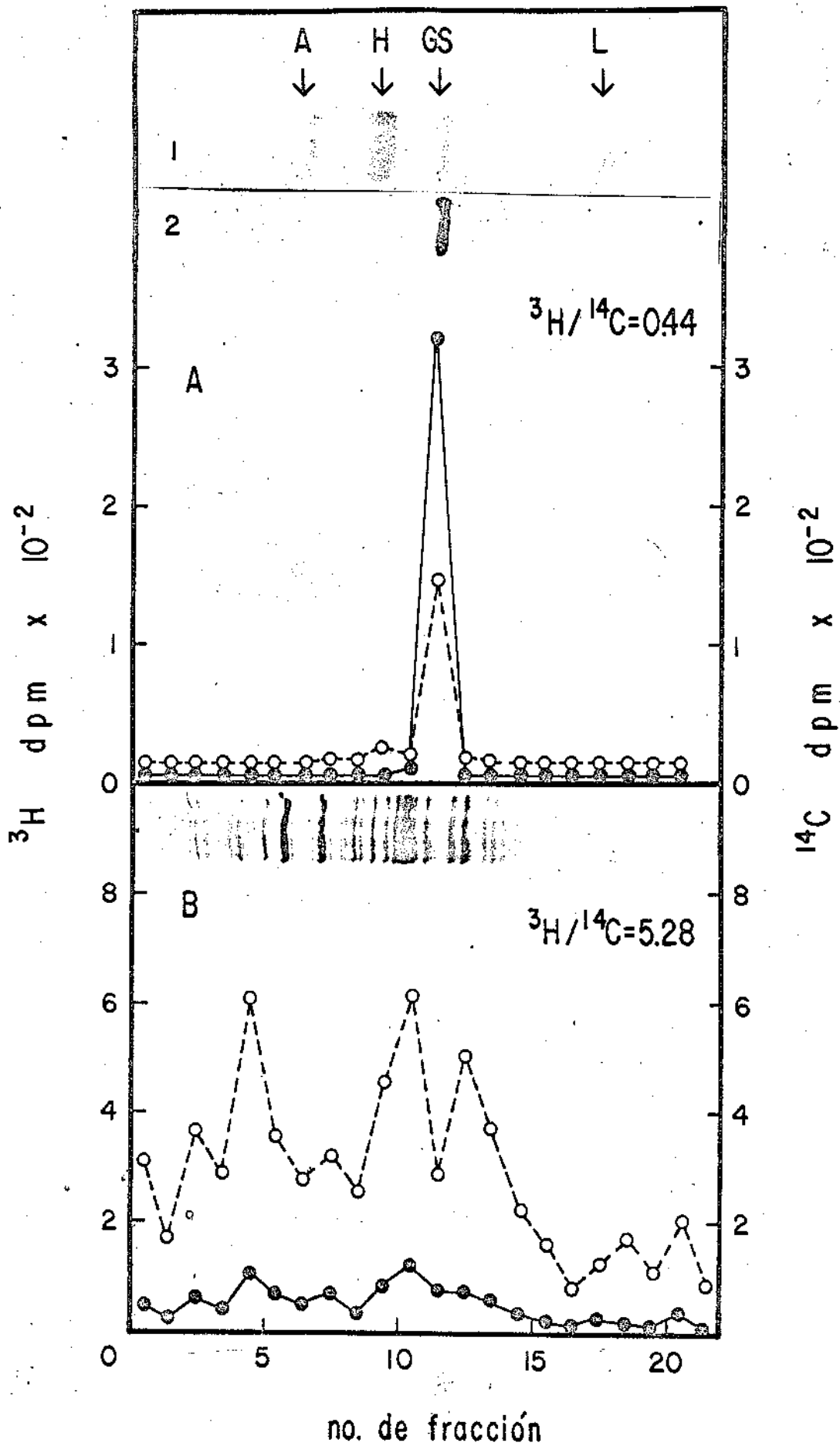


FIG. 6



Figura 7. Velocidad relativa de síntesis de glutamino sintetasa de N. crassa crecida en glutámico o nitrato de amonio como fuente única de nitrógeno. Se crecieron cultivos paralelos de N. crassa en 5 mM de glutámico o en 25 mM de nitrato de amonio. Después de 7.5 hr los cultivos crecidos en glutámico recibieron un pulso de 30 min con leucina  $\left[ C^{14} \right]$  mientras que los crecidos en nitrato de amonio recibieron un pulso de 30 min con leucina  $\left[ H^3 \right]$ . Para cuantificar la radioactividad como  $C^{14}$  y como  $H^3$ , se prepararon extractos del micelio de ambos cultivos, se mezclaron y procesaron como se indicó en la leyenda de la figura 5, en ambos: glutamino sintetasa y proteína total. Los símbolos empleados son como los de la figura 6.

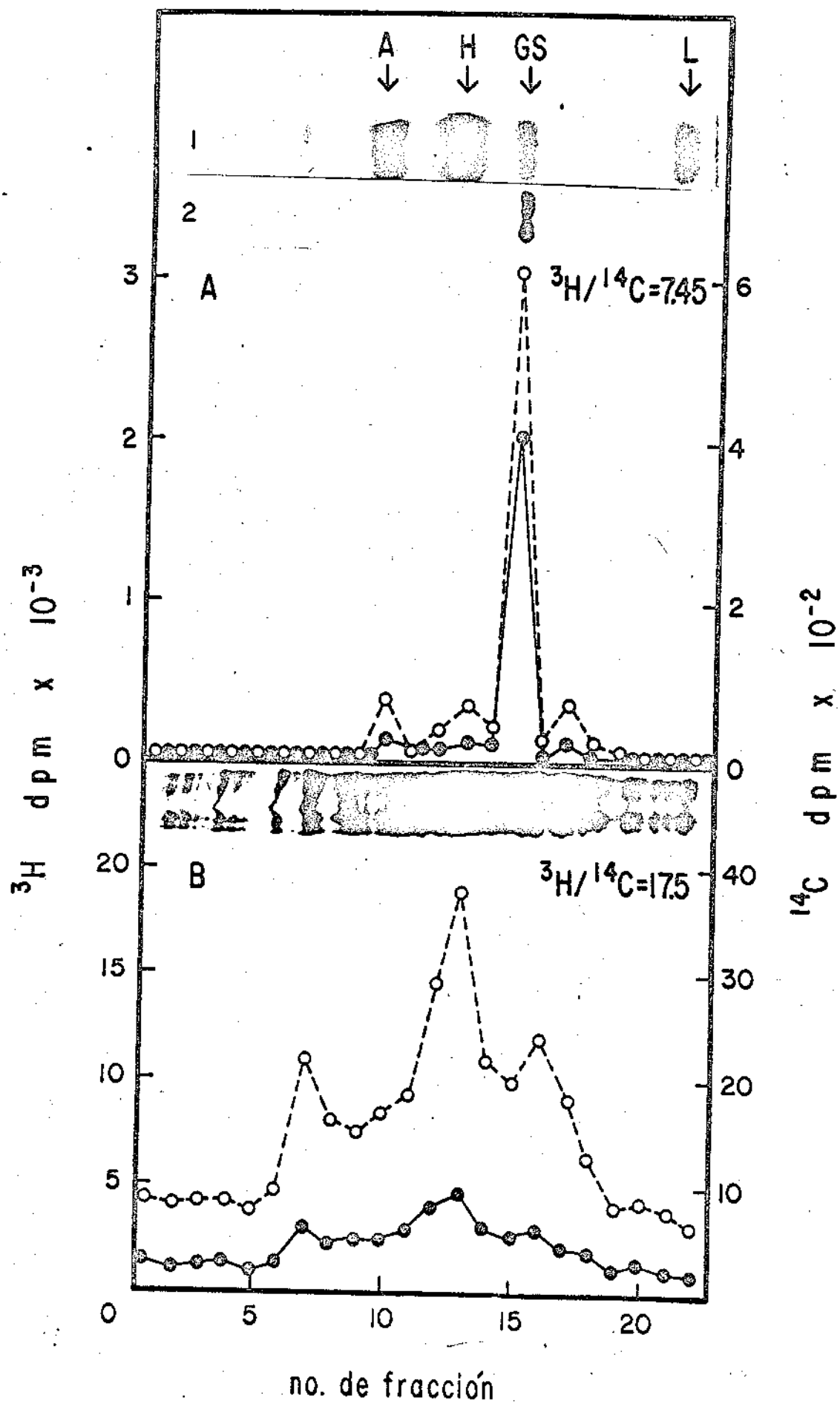


Figura 8. Degradación de proteínas totales en N. crassa en presencia de glutámico como fuente única de nitrógeno. Un auxótrofo de leucina de N. crassa fue crecido en 20  $\mu\text{g/ml}$  de leucina y 5 mM de glutámico. Después de 4 hr el cultivo fue marcado radioactivamente por 60 min con leucina  $\left[ \text{H}^3 \right]$ , 4  $\mu\text{Ci/ml}$ . El micelio fue entonces lavado exhaustivamente y el crecimiento se continuó en medio conteniendo leucina no marcada (20  $\mu\text{g/ml}$ ) y 5 mM de glutámico. A los tiempos indicados después de la transferencia al medio sin marca, las muestras se procesaron para determinar proteína y radioactividad incorporada en proteína total ( ver Material y Métodos). Cuadro A, contenido de proteína por mililitro de cultivo. Cuadro B, radioactividad incorporada en proteína total; ●————● radioactividad incorporada por mililitro de cultivo; ○-----○ radioactividad incorporada por miligramo de proteína.

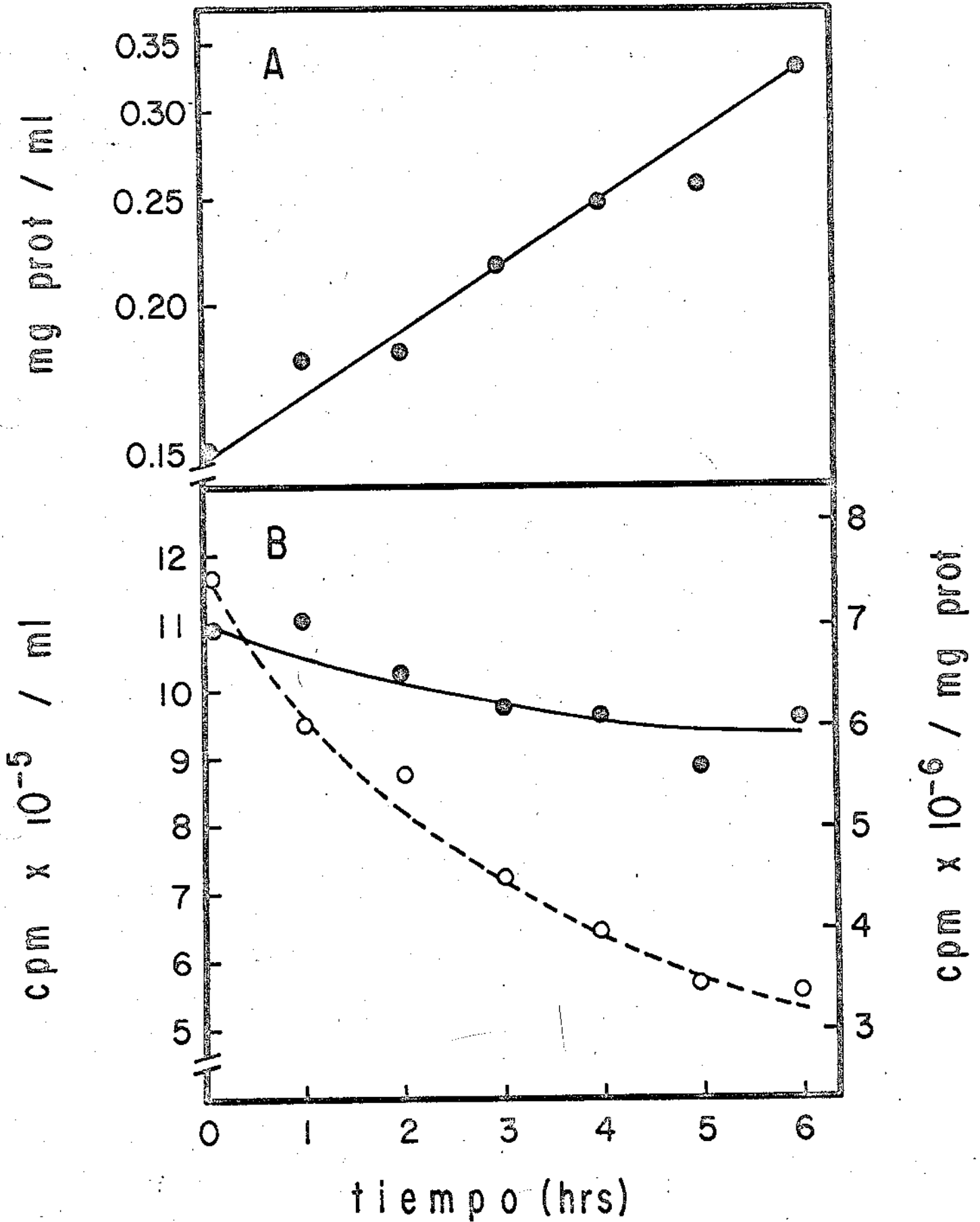


FIG. 6

## TABLA I

El auxótrofo de leucina de N. crassa se creció en diferentes fuentes de nitrógeno, como se indica, en presencia de 20 µg/ml de leucina. Después de 4 hr cada cultivo fue dividido, la mitad fue marcada durante 60 min con leucina  $[C^{14}]0.5 \mu\text{Ci/ml}$  mientras que la otra mitad fue marcada con leucina  $[H^3] 4 \mu\text{Ci/ml}$ . El cultivo marcado con  $C^{14}$  fue filtrado y el micelio congelado a  $-70^\circ\text{C}$ . El micelio marcado con  $H^3$  fue lavado exhaustivamente y el cultivo se continuó creciendo 4 hr más en medio fresco conteniendo leucina no marcada (20 µg/ml) y la misma fuente de nitrógeno. Para cada fuente de nitrógeno, los extractos de cultivos marcados con  $C^{14}$  y  $H^3$  se mezclaron y las relaciones  $H^3/C^{14}$  de proteína total y de glutamino sintetasa fueron determinadas como se describe en la figura 5. El porcentaje de degradación de proteína total fue calculado de la radioactividad remanente en los cultivos marcados con  $H^3$  y  $C^{14}$ , 4 hr después de la transferencia del cultivo al medio no radioactivo.

TABLA 1

DEGRADACION DE GLUTAMINO SINTETASA Y PROTEINAS TOTALES  
 EN Neurospora crassa CRECIENDO EN DIFFERENTES FUENTES DE  
 NITROGENO.

FUENTE DE NITROGENO	DEGRADACION DE PROTEINAS TOTALES (%)	RELACION $^3\text{H}/^{14}\text{C}$		
		TOTALES	G.S.	TOTALES/G.S.
GLUTAMICO	10	6.5	7.7	0.85
GLUTAMINA	17	5.4	5.5	0.98
AMONIO	21	4.2	3.8	1.1

La actividad específica de la glutamina sintetasa fue medida como se describió en Material y Métodos, en los extractos de los experimentos mostrados en las figuras 6 y 7. La síntesis fue calculada dividiendo la relación  $H^3/C^{14}$  en glutamina sintetasa entre la relación  $H^3/C^{14}$  en proteína total, de los datos obtenidos en los experimentos presentados en las figuras 6 y 7. La degradación fue calculada por dividir la relación  $H^3/C^{14}$  en proteína total entre la relación  $H^3/C^{14}$  el glutamina sintetasa en los experimentos presentados en la tabla 1. Estos datos fueron normalizados a la unidad, en base a los datos obtenidos en glutámico.

TABLA 2

TABLA 2

VELOCIDADES RELATIVAS DE SINTESIS Y DEGRADACION DE  
 GLUTAMINO SINTETASA EN Neurospora crassa CRECIENDO -  
 EN DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO.

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ESPECIFICA <sup>1</sup>	SINTESIS	DEGRADACION
GLUTAMICO	1,	1	1
GLUTAMINA	0.08	0.08	1.15
AMONIO	0.25	0.40	1.30