

00581

2
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**GLUTAMINO SINTETASA DE *Catharanthus roseus*:
PURIFICACION, CARACTERIZACION Y REGULACION**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)**

**Presenta la M. en C.
MA. DE LOURDES MIRANDA HAM**

1992.



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.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
1. ASIMILACION DE AMONIO	2
2. GLUTAMINO SINTETASA	3
2.1 PURIFICACION	3
2.2 ENSAYO	5
2.3 DISTRIBUCION EN LA PLANTA	5
2.4 ESTRUCTURA CUATERNARIA	5
2.5 ISOENZIMAS	6
2.5.1 LA ISOENZIMA CLOROPLASTICA	7
2.5.2 LAS ISOENZIMAS CITOSOLICAS	7
2.6 PROPIEDADES CATALITICAS	8
2.6.1 PARAMETROS CINETICOS	8
2.6.2 REQUERIMIENTOS DE IONES DIVALENTES	8
2.6.3 ESTABILIDAD	9
2.6.4 MECANISMO DE REACCION	9
2.7 REGULACION	10
2.7.1 NUCLEOTIDOS	10
2.7.2 AMINOACIDOS Y OTROS LIGANDOS	10
2.7.3 NITROGENO	12
2.7.4 LUZ	12
2.7.5 ESTRES	13
HIPOTESIS	14
METAS	15
METODOLOGIA	16
DISCUSION	17
BIBLIOGRAFIA	23

ABREVIATURAS

- **ADP Adenosina 5'-difosfato**
- **AMP Adenosina 5'-monofosfato**
- **ARNm Acido ribonucléico mensajero**
- **ATP Adenosina 5'-trifosfato**
- **DEAE Dietil amino etano**
- **DTT Ditiotreitól**
- **GS Glutamino sintetasa**
- **GDH Glutamato deshidrogenasa**
- **GOGAT Glutamato sintasa**
- **MPa Megapascales**
- **MSO Metionina sulfoximina**
- **PA₂LA 3-(fosfonoacetilamido)-L-alanina**
- **PALAB 4-(fosfonoacetil)-L-2-aminobutirato**

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta el estudio sistemático de la enzima glutamino sintetasa en hojas de *Catharanthus roseus*, que incluye su purificación, caracterización y el estudio de su regulación durante diferentes condiciones medio ambientales.

Se determinó que la glutamino sintetasa se encuentra como dos isoenzimas en la hoja. Estas isoenzimas se denominaron GS1 y GS2. La GS1 está localizada en el citoplasma, mientras que la GS2 se encuentra dentro del cloroplasto. La masa molecular de las isoenzimas es de 46 y 48 kDa, respectivamente. Las K_m para los sustratos glutamato, hidroxilamina y ATP son diferentes. La actividad de la GS2 muestra una dependencia total de la presencia de agentes reductores. La GS1 presenta mayor resistencia a la incubación a altas temperaturas que la GS2, la cual pierde totalmente su actividad después de 15 minutos a 50°C. Se demostró que la isoenzima cloroplástica está glucosilada usando tres técnicas diferentes. La presencia de nitrato en el medio provoca un aumento en la actividad de la GS solamente observado en raíces.

Durante los períodos de estrés, la actividad enzimática disminuye. No hay síntesis *de novo* de esta enzima y hay una pérdida preferencial de la isoenzima cloroplástica. Esta pérdida se atribuye a los cambios que sufre su nivel de glucosilación.

SUMMARY

A systematic study, which includes the purification, characterization and regulation of glutamine synthetase of leaves of *Catharanthus roseus* was made.

Glutamine synthetase exists as two isoenzymes in the leaves. These were named GS1 and GS2, according to their elution order from an anionic exchange column and to the current literature on this enzyme. GS1 is located in the cytosol, while GS2 is in the chloroplast. Their respective molecular weights are 46,000 and 48,000. There is an absolute requirement of reducing agents in the case of GS2. Their affinities for the substrates glutamate, hydroxylamine and ATP differ greatly. GS1 resists heat treatments better than GS2, which at 50°C loses its activity completely. It was demonstrated by three different approaches that the chloroplastic isoenzyme is glycosylated. The presence of nitrate induces an increment in GS activity in the roots but not in the leaves.

During stress periods, there was a decline of GS activity with the diminishing water potential. There was no *de novo* synthesis of glutamine synthetase and there was a preferential loss of the chloroplastic isoenzyme. This latter fact is explained in terms of decreases in the glycosylation level of this isoenzyme.

INTRODUCCION

Las plantas tienen una reserva limitada de nitrógeno disponible para su desarrollo y crecimiento. Es por esto, que las vías de asimilación primaria y secundaria de este elemento deben trabajar de manera eficiente bajo todas las condiciones medio ambientales a las que éstas se ven sometidas.

Existe un número cada vez mayor de reportes sobre los patrones protéicos de diferentes órganos durante los períodos en que las plantas se enfrentan a condiciones de estrés. Sin embargo, en muy contados casos el estudio de estos patrones ahonda en la identificación de las proteínas a las que corresponden las manchas en las autorradiografías.

Por otra parte, el estudio del metabolismo nitrogenado en plantas que producen metabolitos secundarios se ha limitado a la cuantificación de las diferentes actividades enzimáticas. Los datos de Ríos-Chávez (1987) y Miranda-Ham y Loyola-Vargas (1987, 1988), sugieren que las enzimas que asimilan el amonio aisladas de plantas sometidas a tratamientos de estrés hídrico o salino son diferentes de las provenientes de una planta control.

En el presente trabajo se presenta el estudio sistemático de la enzima glutamino sintetasa en hojas de *Catharanthus roseus*, que incluye su purificación, caracterización y el estudio de su regulación durante diferentes condiciones medio ambientales.

ANTECEDENTES

1. ASIMILACION DEL AMONIO

Tanto el nitrato como el nitrógeno atmosférico, dos de las principales fuentes de nitrógeno inorgánico disponibles para las plantas, deben reducirse hasta amonio antes de que este elemento se incorpore a la materia orgánica. Puesto que los aminoácidos, ya sea libres o formando parte de las proteínas, son la forma predominante de N orgánico, se considera que el producto primordial de la asimilación del N es el grupo α -amino.

Además de la fuente externa primaria de amonio, se ha demostrado que hay otras fuentes, como por ejemplo las reacciones que lo liberan de su forma orgánica en los tejidos vegetales, en particular de glicina (durante la fotorrespiración), asparagina y arginina. Estas reacciones tienen un significado cuantitativo real: la cantidad de amonio liberado a partir de glicina durante la fotorrespiración puede alcanzar niveles de hasta $80 \mu\text{moles g PF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en las hojas (Keys et al., 1978), lo cual implica varias veces la velocidad calculada para la asimilación neta de amonio.

Hay varias enzimas que, en potencia, son capaces de incorporar al amonio a formas orgánicas como son los aminoácidos o las amidas, como la alanina deshidrogenasa, la aspartato deshidrogenasa, la asparagina sintetasa, la glutamato deshidrogenasa y la glutamino sintetasa (Cuadro 1); de las cuales, solamente las tres últimas han sido descritas en plantas superiores. Si bien la mayoría de las plantas absorben cantidades mínimas del ión amonio a través de sus sistemas radiculares, están equipadas y utilizan las enzimas diseñadas para su asimilación.

Históricamente, se consideraba que la ruta principal de entrada del nitrógeno era la vía de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.4). Esta enzima se encuentra

ampliamente distribuida y es un mecanismo muy activo para la asimilación del amonio.

Cuadro 1. Reacciones de las enzimas que incorporan amonio a aminoácidos o amidas en plantas superiores¹

(1) Piruvato + NH ₄ ⁺ + NADH ----- Alanina + H ₂ O + NAD ⁺	Alanina deshidrogenasa
(2) L-Aspartato + NH ₄ ⁺ + ATP ----- L-Asparagina + H ₂ O + AMP + PPi	Asparagina deshidrogenasa
(3) Oxalacetato + NH ₄ ⁺ + NADH ----- L-Aspartato + H ₂ O + NAD ⁺	Aspartato deshidrogenasa
(4) α-cetoglutarato + NH ₄ ⁺ + NAD(P)H ----- L-glu + H ₂ O + NAD(P) ⁺	Glutamato deshidrogenasa
(5) L-Glutamato + ATP + NH ₄ ⁺ ----- L-Glutamina + ADP + Pi	Glutamino sintetasa

¹ Tomado de Elevation (1989)

La otra candidata para llevar a cabo esta asimilación era la enzima glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2). Sin embargo, el producto de la acción de esta enzima es la glutamina y se desconocía el mecanismo por el cual se realizaba la transferencia del N amido a la posición α-amino de los aminoácidos. En 1970, el grupo de Tempest describió por primera vez una enzima que catalizaba dicha reacción, la glutamato sintasa. Más tarde, esta misma enzima fue encontrada en tejidos vegetales (Dougall, 1974; Fowler et al., 1974; Lea y Milfin, 1974). Una característica clave de la vía de la glutamato sintasa es su naturaleza cíclica, en la que el glutamato actúa como aceptor y como producto de la asimilación del amonio.

2. GLUTAMINO SINTETASA

Se considera, con base en los estudios utilizando ¹⁵N, ¹³N, inhibidores y más recientemente mutantes (Lea et al., 1989), que más del 95% de la asimilación del amonio en las plantas se realiza a través del ciclo de la glutamato sintasa, descrito en la figura 1. Después de la incorporación del amonio en la glutamina por la enzima glutamino sintetasa, el nitrógeno puede ser transferido a una amplia gama de compuestos (Figura 2).

2.1 Purificación

La GS ha sido purificada y caracterizada de un gran número de tejidos vegetales, incluyendo hojas de chícharo (O'Neal y Joy, 1973), *Lemna* (Stewart y Rhodes, 1977), raíces y hojas de arroz (Hirel y Gadal, 1980, 1981), hojas de espinaca (Hirel et al., 1982), hojas de tabaco (Hirel et al., 1984), raíces, nódulos y hojas de *Phaseolus* (Cullimore et al., 1983; Lara et al., 1984), por citar sólo algunos ejemplos.

Es oportuno mencionar que en general se han seguido los esquemas de purificación clásicos, que involucran la precipitación con sulfato de amonio,

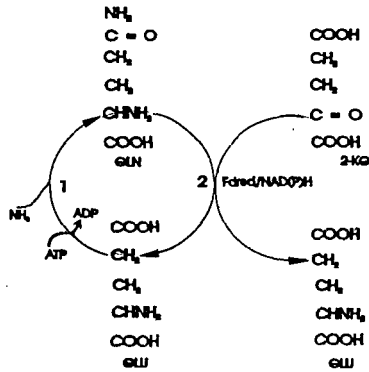


Figura 1. Ciclo de la glutamato sintasa. Enzimas: 1, glutamino sintetasa; 2, glutamato sintasa.

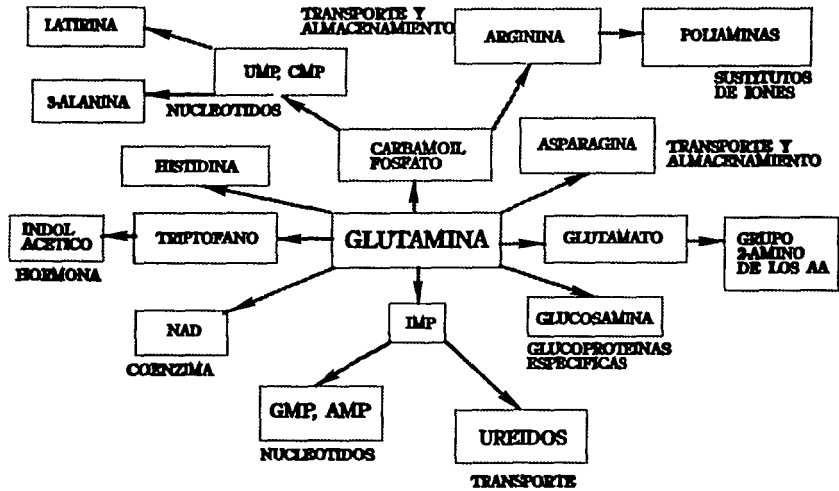
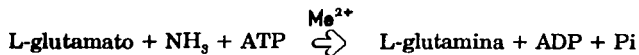


Figura 2. El papel de la glutamina en la transferencia de nitrógeno en las plantas superiores. (Modificado de Miflin et al., 1981)

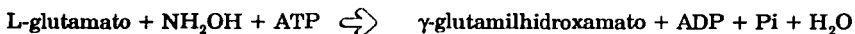
cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de permeación; sin embargo, el uso de columnas de afinidad como la utilizada por Lara y colaboradores (1984), en la que se tiene ácido antranílico unido a Sepharosa y se eluye con un gradiente de AMP, ha venido a revolucionar la manera de purificar GS de tejidos no fotosintéticos; no siendo así en el caso de la enzima aislada de hojas verdes.

2.2 Ensayo

La glutamino sintetasa cataliza la siguiente reacción:



Dadas las dificultades que existen para una separación rápida de la glutamina formada del sustrato glutamato, se ha utilizado a la hidroxilamina como un sustrato alternativo para el amonio:



El γ -glutamilhidroxamato puede ser rápidamente cuantificado por una reacción simple con cloruro férrico en medio ácido para dar un color café que puede ser determinado espectrofotométricamente a 540 nm. Esta reacción mide la actividad de la glutamino sintetasa en el sentido biosintético y hay evidencias de que las K_m y las $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima con hidroxilamina y amonio son similares (Varner, 1960) y que su afinidad por los otros sustratos no se ve afectada por el uso de este compuesto (O'Neal y Joy, 1974).

2.3 Distribución en la planta

La glutamino sintetasa parece estar distribuída a lo largo de toda la planta, aún cuando sus niveles difieran de manera importante entre un tejido y otro (Lee y Stewart, 1978; Stewart y Rhodes, 1978). En la mayoría de los casos, la actividad encontrada en hojas es mucho mayor que en la raíz; empero si existe la necesidad de asimilar una gran cantidad de amonio en este último, la situación puede revertirse (Lee y Stewart, 1978).

2.4 Estructura cuaternaria de la GS

La GS de las plantas superiores tiene una masa molecular calculada en el rango de 300 a 370 kDa y está compuesta de ocho subunidades idénticas (o casi idénticas) (Stewart et al., 1980). Tanto su tamaño como su estructura cuaternaria la hacen muy semejante a la enzima aislada de mamíferos pero es bastante diferente de

la bacteriana, que tiene 12 subunidades de cerca de 50 kDa (Meister, 1974; Stadtman and Ginsburg, 1974). Las micrografías de la GS de nódulos de soya (McParland et al., 1976) y de lupino (Tsuprun et al., 1987) muestran que las subunidades se encuentran formando dos tetrámeros planos, paralelos entre sí y a una distancia de 1 nm, que a su vez conforman un cubo, cuyos lados miden aproximadamente 10 nm. Sin embargo, se ha descrito una conformación ligeramente diferente para las enzimas citosólicas de la hoja y la semilla de chícharo (Pushkin et al., 1985), de la raíz (Golova et al., 1984) y de la hoja de calabaza (Pushkin et al., 1981) y para la enzima cloroplástica de la hoja de chícharo (Tsuprun et al., 1980): el tetrámero de una capa está girado 40° del eje de simetría con respecto a la otra capa.

Existe otro modelo, sugerido por el grupo de Eisenberg (1987) con base en las similitudes que existen entre las propiedades catalíticas y regulatorias de la GS en procariotes y eucariotes. Este modelo propone que los dos tetrámeros planos de la enzima octamérica están compuestos de dos pares de subunidades cada uno, y que cada par de subunidades forma un sitio activo: los otros cuatro sitios de cada capa no podrán interactuar; por lo tanto, solamente habrá cuatro sitios activos por unidad de enzima. Este modelo se ve apoyado por la evidencia obtenida de la estequiometría de la unión de L-metionina-S-sulfoximina (Tate y Meister, 1971) y de Mn^{2+} (Wedler et al., 1982). En oposición, estudios más recientes de unión de Mg^{2+} (Maurizi et al., 1986), de la titulación de grupos sulfhídricos (Ericson y Brunn, 1985) y de marcaje del sitio activo con ^{14}C -fosfotricina y $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$ (Höpfner et al., 1988) indican que existen ocho centros reactivos por octámero de GS.

2.5 Isoenzimas

Una característica distintiva de la GS en las plantas superiores es la existencia, dentro de las mismas, de diferentes isoenzimas localizadas en diferentes compartimentos subcelulares. Las hojas verdes contienen generalmente dos isoenzimas, designadas GS1 y GS2, que se encuentran en el citosol y en el cloroplasto, respectivamente (Stewart et al., 1980; Miflin y Lea, 1980; McNally y Hirel, 1983).

La GS2 puede ser separada de la GS1 por medio de cromatografía de intercambio iónico y el análisis comparativo de las dos isoenzimas en diferentes especies muestra que poseen diferentes estabidades térmicas, pH óptimos y K_m para el glutamato, el amonio y el ATP (Mann et al., 1979; Acaster y Weitzman, 1985). Las masas moleculares de las subunidades de GS1 y GS2, calculadas de los datos de la electroforesis con SDS, indican que la subunidad cloroplástica es ligeramente más grande (43-45 kDa) que la citosólica (37-43 kDa) (Ericson, 1985; Hirel et al., 1984, 1987; Lara et al., 1984; Nato et al., 1984; Tingey y Coruzzi, 1987; Tingey et al., 1987).

Una separación sistemática de estas formas llevaron al grupo de Gadal (McNally et al., 1983) a proponer cuatro patrones diferentes de isoenzimas. Estos grupos se caracterizan por tener: (a) sólo GS en el citosol; (b) solamente GS cloroplástica; (c) a la GS citosólica como un componente menor de la actividad total

de GS y (d) cantidades aproximadamente iguales de la enzima citosólica y de la enzima cloroplástica.

2.5.1 La isoenzima cloroplástica

Las subunidades de GS2 en *Phaseolus vulgaris* (Lara et al., 1984) y en tabaco (Hirel et al., 1984; Nato et al., 1984) pueden resolverse en cuatro variantes al realizar un enfoque isoeléctrico. Nato y colaboradores (1984) demostraron que la GS2 de hoja de tabaco está glucosilada, hecho que podría explicar la existencia de las variantes; empero, el análisis de la GS2 de espinaca, chícharo y *Nicotiana plumbaginifolia* no han podido confirmar la presencia de residuos de azúcares (Ericson, 1985; Tingey y Coruzzi, 1987; Tingey et al., 1987). Otras modificaciones post-traduccionales (tales como fosforilación o proteólisis limitada), o incluso artificios durante la extracción de la enzima podrían también explicar la heterogeneidad de las subunidades.

2.5.2. Las isoenzimas citosólicas

NODULOS. Los nódulos contienen niveles altos de GS, que pueden llegar a constituir el 2% de la proteína soluble total (McParland et al., 1976). Durante el desarrollo de los nódulos, hay un incremento notable en la actividad de GS que coincide con la aparición de la nitrogenasa y la leghemoglobina (Cullimore y Bennett, 1988). Lara y colaboradores (1983) separaron dos isoenzimas de GS a partir de nódulos por medio de cromatografía de intercambio iónico, a las que designaron GS_{n1} y GS_{n2}. Una de las dos isoenzimas de nódulos (GS_{n2}) es indistinguible de la isoenzima de la raíz (GS_r) (Cullimore y Mifflin, 1984), por sus características físicas e inmunológicas, así como por sus propiedades cinéticas (Cullimore et al., 1983).

En el análisis de las subunidades de GS en raíces, hojas y nódulos de *Phaseolus vulgaris* se han identificado varios polipéptidos, denominados α , β y γ , que tienen masas moleculares similares pero difieren en sus puntos isoeléctricos (Lara et al., 1984). La GS_{n2} está compuesta principalmente por subunidades β , mientras que la GS_{n1} posee ambas β y γ , siendo esta última el constituyente mayoritario. Cuando se separaron las isoenzimas de nódulos de *P. vulgaris* en un gel nativo, aparecieron de 6 a 9 bandas, sugiriendo la posibilidad de diferentes asociaciones de β y γ , para dar lugar a formas hetero-octaméricas (Robert y Wong, 1986). La existencia de dichas formas ha sido confirmada mediante cromatografía de alta resolución (FPLC) (Cullimore y Bennett, 1988).

RAICES. Toda la evidencia obtenida hasta ahora parece indicar muy pocas diferencias entre las enzimas citosólicas de raíz y hoja. Las propiedades cinéticas y regulatorias de dichas isoenzimas son idénticas en cebada (Mann et al., 1980) y en arroz (Hirel y Gadal, 1980). En *P. vulgaris* ambas isoenzimas están compuestas por los mismos polipéptidos (α y β) (Lara et al., 1984).

En las raíces, la GS se encuentra predominantemente en el citosol (Suzuki et al., 1984), con una pequeña proporción en los plástidos (Emes y Fowler, 1979).

2.6 Propiedades catalíticas

2.6.1 Parámetros cinéticos

Los valores de las K_m aparentes por los sustratos de diferentes especies son muy similares (Cuadro 2). La característica más importante es su gran afinidad por el amonio (K_m 1-2 x 10^{-5} M). Los valores de K_m para el glutamato (1-13 mM) y el ATP (0.1-1.5 mM) varían y son proporcionales a la concentración del otro (O'Neal y Joy, 1974). Stewart y Rhodes (1977) encontraron que la K_{m_p} para el glutamato variaba con las concentraciones de ATP y Mg^{2+} . En contraste, la K_{m_p} para el ATP presentó una variación menor con respecto a la concentración de glutamato, amonio ó Mg^{2+} .

Cuadro 2. Distribución de isoformas y parámetros cinéticos de la glutamino sintetasa en algunas especies vegetales¹.

ESPECIE	% ACTIVIDAD		K_m GLUTAMATO (mM)		K_m ATP (mM)		K_i DL-PPT (μ M)	
	GS ₁	GS ₂	GS ₁	GS ₂	GS ₁	GS ₂	GS ₁	GS ₂
Cebada	9	91	4.9	8.2	0.3	0.6	3.5	6
Cassia	---	100	---	7.3	---	0.9	---	8.5
Maíz	42	58	5.2	9.8	0.4	0.9	2	4
Soya	---	100	---	4.1	---	0.3	---	8
Remolacha	---	100	---	8.4	---	1.3	---	6.5
Trigo	4	96	ND ²	7.7	ND	0.9	ND	9
Avana	---	100	---	5.5	---	0.6	---	5

¹Tomado de Acaster y Weitzman (1988)

²No determinado

La K_{m_p} para el glutamato es relativamente alta y puede ser significativa con respecto a las relaciones sustrato-producto del ciclo de la glutamato sintasa (Stewart y Rhodes, 1977). Como el glutamato es tanto el sustrato de la glutamino sintetasa como el producto de la reacción catalizada por la glutamato sintasa, existe la posibilidad de un reciclaje excesivo del glutamato a expensas de ATP cuando la concentración de amonio es muy elevada. Esta elevada K_{m_p} de la glutamino sintetasa para el glutamato podría reducir la competencia por el glutamato entre ella y las otras reacciones que lo requieren como sustrato.

2.6.2 Requerimientos de iones divalentes

La GS de plantas superiores presentan una dependencia absoluta por cationes divalentes, que puede satisfacerse con Mg^{2+} y en menor grado, con Mn^{2+} y Co^{2+} (O'Neal y Joy, 1974).

La curva de respuesta para Mg^{2+} es de tipo sigmoide para algunas GS (O'Neal y Joy, 1974; Stewart y Rhodes, 1977a). Si la concentración de ATP se aumenta, la respuesta se vuelve cada vez más sigmoide, y se requieren concentraciones más altas de Mg^{2+} para obtener actividad máxima. Esto indica que o el ATP libre inhibe la reacción o que se necesitan cationes divalentes libres para mantener la actividad total. Esta última aseveración parece ser la correcta, puesto que al aumentar la concentración de Mg^{2+} sobre la proporción unitaria de Mg^{2+}/ATP , se estimula la actividad.

Kanamori y Matsumoto (1972) demostraron que Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} inhiben completamente a la enzima de raíces de arroz, tal vez debido a que reaccionan con los grupos tiol, dado que la enzima inactivada durante la preincubación con cloruro de mercurio se reactivó con la adición de cisteína.

2.6.3 Estabilidad

Cuando se tiene una preparación pura de glutamino sintetasa, se deben añadir una serie de compuestos para preservar su actividad como son glicerol, glutamato, magnesio, etilenglicol, etc.; aun cuando, a veces, la combinación de uno o más de estos preservadores puede producir efectos negativos.

2.6.4 Mecanismo de reacción

El glutamato se une al sitio activo en una conformación extendida, con el hidrógeno dirigido hacia el exterior de la enzima. Los análogos que pueden ser reconocidos por la enzima son D-glutamatos α -sustituídos treo- β -sustituídos y los L-glutamatos treo- α -sustituídos.

La GS puede ser inhibida por numerosos compuestos como la metionina sulfoximina (MSO) (Ronzio et al., 1969a, 1969b; Wedler y Horn, 1976), la fosfinotricina (Bayer et al., 1972), la 5-hidroxisilina (Ladha et al., 1978), la 3-(fosfonoacetilamido)-L-alanina (PA_2LA) (Wedler y Horn, 1976) y la 4-(fosfonoacetil)-L-2-aminobutirato (PALAB) (Wedler et al., 1980). Las enzimas de todas las fuentes se inhiben con estos compuestos, pero hay diferencias en la sensibilidad de las enzimas de origen procariote y eucariote. La capacidad de estos compuestos para actuar como inhibidores se debe a su gran similitud con el intermediario propuesto de la reacción de la GS, γ -glutamilfosfato. Sin embargo, la MSO inhibe de manera más efectiva a la enzima de *E. coli* que PA_2LA ó PALAB; en tanto que lo opuesto es aplicable a la enzima aislada de cerebro de ovinos o de semillas de chícharo (Wedler y Horn, 1976; Wedler et al., 1980). De los datos obtenidos con los tres inhibidores, Wedler ha propuesto diferencias entre los mecanismos de las enzimas de fuentes procariote y eucariote. La enzima de *E. coli* forma el γ -glutamilfosfato sólo de manera transitoria y probablemente estabiliza un intermediario tetrahedral. La enzima de semilla de chícharo, en cambio, estabiliza al intermediario trigonal α -glutamilfosfato. La diferencia clave entre las dos enzimas es

la interacción de un catión divalente con el C5 del glutamato dentro del sitio activo en *E. coli*, que no se da en la enzima de chícharo.

2.7 Regulación

2.7.1 Nucleótidos

Varios autores han descrito la inhibición de la glutamino sintetasa de angiospermas por una variedad de nucleótidos. Varner y Webster (1955) demostraron que la enzima de semilla de chícharo es inhibida por ADP y fosfato. O'Neal y Joy (1975) encontraron que de una gama de nucleótidos, sólo en el caso del ADP y del 5'-AMP se presentaba una inhibición significativa de la actividad que dependía de Mg^{2+} en la GS de hojas de chícharo y que ésta era de tipo competitivo con respecto al ATP. El mismo esquema se presenta en *Lemna minor* (Stewart y Rhodes, 1977a) y para la enzima de la raíz de arroz (Kanamori y Matsumoto, 1972). El GTP provoca una disminución sustancial de la actividad que es de tipo acompetitivo con respecto al ATP (Kanamori y Matsumoto, 1972).

En general, cuando se prueba el efecto inhibitorio que pueden tener los nucleótidos sobre la actividad de la GS, es necesario incluir una concentración suficiente de cationes divalentes para asegurar que el efecto no se debe simplemente a la falta de estos iones debido a su quelación por los nucleótidos.

La inhibición por ADP y AMP indican la posibilidad de la existencia de un control de la enzima dado por la carga energética de la célula (Atkinson, 1968; McParland et al., 1976; O'Neal y Joy, 1975; Stewart y Rhodes, 1977a).

2.7.2 Aminoácidos y otros ligandos

La reacción catalizada por la glutamino sintetasa se ha considerado como el primer paso en una vía múltiple y compleja que lleva a la síntesis de varios metabolitos que son precursores de proteínas y de ácidos nucleicos. La presencia de la glutamato sintasa implica que en los organismos que asimilan amonio por la vía glutamino sintetasa/glutamato sintasa, cualquier compuesto nitrogenado podría considerarse como un producto final potencial.

Algunos de los resultados obtenidos en los estudios de inhibición por retroalimentación de diversos aminoácidos se muestran en el cuadro 3. En la mayoría de los casos se han determinado algunos efectos; sin embargo, la inhibición ha sido punto menos que completa y las concentraciones requeridas de los aminoácidos son muy altas. Estos resultados contrastan con aquéllos de otras enzimas vegetales responsables de la síntesis de los esqueletos carbonados para los aminoácidos, donde se obtiene el 50% de la inhibición a concentraciones del orden de 10-100 μM (Mifflin and Lea, 1977). La efectividad de los aminoácidos como inhibidores es aditiva, en comparación con los efectos de los nucleótidos, empero aún la máxima inhibición es de sólo el 62% (Mifflin and Lea, 1977).

Cuadro 3. Efecto de los aminoácidos en la actividad de la glutamino sintetasa

Fuente de la enzima	Aminoácido	Concentración (mM)	Concentración medida en cloroplasto (mM)	Inhibición de GS (%)
<i>Lemna</i> (Stewart y Rhodes, 1977)	Aspartato	25	3.41 ²	42
	Alanina	25	9.04 ^{1,3}	60
	Glicina	25	0.76 ^{1,3}	60
	Serina	25	1.32 ^{1,3}	54
	Alanina, glicina y serina	5	---	53
<i>Chlorella</i> (Akimova et al. 1976)	Aspartato	50	4.9, 5.2 ⁴	50
	Alanina	50	1.08, 9.9 ^{3,4}	32
	Glicina	50	0.2, 4.8 ⁴	32
	Serina	50	2.76, 10.7 ⁴	32
<i>Pisum sativum</i> hoja (O'Neal y Joy, 1975)	L-Alanina	12	---	31
	D-Alanina	12	---	14
	Glicina	12	---	7
	Serina	12	---	14
<i>Glycine max</i> nodulos (McFarland et al., 1976)	Glicina	5	---	13
	Alanina	5	---	9
	Glutamina	5	---	7
	Triptofano	5	---	4

¹ Cloroplastos de hoja de chícharo (Mills y Joy, 1980)

² Utilizando técnicas de aislamiento de protoplastos

³ Técnicas de aislamiento mecánico

⁴ Cloroplastos de maíz (Chapman y Leech, 1979)

Aunque el carbamoil fosfato es inhibitorio para algunas GS (Meister, 1974; Stadtman and Ginsburg, 1974), incluyendo a la de hojas de chícharo (O'Neal and Joy, 1975), la inhibición es más marcada con magnesio que con manganeso, y en *Lemna* no hay ningún efecto hasta una concentración de 5 mM. El 2-oxoglutarato y el citrato activan a la enzima de mamíferos; no obstante, esta activación es mínima en el caso de la GS de semilla de chícharo (Tate y Meister, 1971) y llega solamente al 50% en raíces de arroz. Kanamori y Matsumoto (1972) sugieren que esto podría ser significativo en el control de la actividad de la GS en raíz, en cuanto a que la estimulación ocurre con 2-oxoglutarato (un sustrato de la glutamato sintasa) y con aquellos intermediarios que están antes que él en el ciclo de Krebs, más no con los metabolitos que están después del 2-oxoglutarato.

El papel de los diferentes efectores mencionados en la regulación de la glutamino sintetasa *in vivo*, no está aún claro. Como se ilustra en el trabajo de Sims y Ferguson (1974) la demostración de una regulación "*in vitro*" no implica directamente una regulación *in vivo*. La observación de que varios productos finales de la vía de la glutamina la pueden inhibir en diferentes grados, mientras que el 2-oxoglutarato, aceptor carbonado del nitrógeno de la amida de la glutamina, la activa, podría señalar la existencia de un control fino de la actividad enzimática en el cloroplasto, donde las concentraciones de estos compuestos, debida a la compartimentalización, pueden ser relativamente altas.

2.7.3 Nitrógeno

En las enterobacterias, tanto la expresión como la actividad de la GS se ven afectadas por la fuente de nitrógeno. Este efecto dual está mediado por la relación glutamina:2-oxoglutarato en la célula y esta señal metabólica se transduce en una cascada de proteínas regulatorias que afectan la transcripción de los genes para la GS, la adenilación reversible de la enzima y el aumento consecuente en la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación (Magasanik, 1988). A través de estos controles la actividad de la GS puede aumentar sustancialmente en condiciones extremas de falta de nitrógeno y se reprime severamente cuando hay amonio en exceso.

En las plantas superiores, la GS no se adenila y aunque una gama de compuestos nitrogenados pueden actuar como inhibidores por retroalimentación *in vitro*, su significancia en la modulación de la actividad *in vivo* aún no se ha establecido (Stewart et al., 1980). El grupo de Hirel (1987) ha sugerido que la fuente de nitrógeno afecta, sin embargo, la expresión de algunos de los genes para GS, cuando menos en soya. Sus resultados sugieren que este control metabólico de la expresión génica es muy diferente al que opera en bacterias y que los genes que codifican para la GS citosólica se inducen, más que se reprimen, por amonio. Esta inducción por sustrato se ha demostrado en otros genes involucrados en la asimilación de nitrógeno en plantas, pues la nitrato reductasa de plantas superiores (Calza et al., 1987; Cheng et al., 1986; Crawford et al., 1986) y la glutamato deshidrogenasa de *Chlorella* (Schmidt, 1989) están reguladas de manera similar.

El trabajo de Hirel y colaboradores (1987) ha demostrado que la adición de sales de amonio a las raíces de soya lleva a un incremento de los niveles de ARNm de GS citosólica. La adición de nitrato no tiene el mismo efecto. Los resultados obtenidos con *P. vulgaris* no han podido confirmar el aumento en ARNm en las raíces después de la adición de amonio.

2.7.4. Luz

En las hojas de muchas plantas, particularmente de las C_3 , se ha demostrado que la luz incrementa el nivel de la isoenzima cloroplástica (GS_2) en relación con la GS_1 (McNally and Hirel, 1983). Un efecto similar se ha observado en los hipocótilos y los cotiledones de plántulas en germinación. Estudios con marcaje por densidad, con inhibidores de la síntesis de proteínas y con anticuerpos han sido utilizados para demostrar que el aumento en GS_2 durante la iluminación, se debe en su mayor parte a una síntesis *de novo* (McNally y Hirel, 1983).

El ARNm de la GS_2 aumenta casi 20 veces dentro de las primeras 72 horas de iluminación de brotes etiolados (Edwards and Coruzzi, 1989; Tingey et al., 1988); mientras que sólo hay un aumento de cuatro veces en la oscuridad seguida de un flash saturante de luz roja, que puede revertirse con luz del espectro rojo lejano. Estos experimentos parecen indicar que la inducción por luz de la expresión del gene de GS_2 está mediada, al menos en parte, por fitocromo. Esta lenta acumulación del

ARNm es similar a la observada en los casos del ARNm de los genes *rbcS* y *Cab* (Kaufman et al., 1986).

La expresión del ARNm de la GS cloroplástica mediada por la luz es mucho más complicada de lo que a primera vista podría deducirse; puesto que la respuesta del efecto a la luz roja es tan sólo del 20-50% de la observada con luz blanca. Una posibilidad es que se encuentre involucrado un fotorreceptor de luz azul, como el implicado en la expresión de *rbcS* (Fluhr y Chua, 1986). Además, se ha demostrado que la inducción por luz blanca ocurre más rápidamente en plantas con cloroplastos maduros fotosintéticamente competentes que en plantas etioladas. Este hecho podría interpretarse como una indicación de que la inducción máxima requiere de factores asociados a la presencia de cloroplastos maduros (Edwards y Coruzzi, 1989).

2.7.5 Estrés

Existe una gran variabilidad en cuanto al comportamiento de la GS bajo condiciones de estrés. La actividad de la GS se estimula en plantas resistentes a salinidad de *Pisum sativum* y *Zea mays* y en la halófito *Suaeda maritima*; mientras que se observa una disminución importante en *Vigna radiata* (Boucaud y Billard, 1981; Rakova et al., 1978).

En el trabajo realizado por Ríos-Chávez (1987) en plantas de *Catharanthus roseus* se pudieron observar diferencias en la actividad de GS con respecto a la edad de la planta, al tejido y al tipo de estrés al que se ve sometida. La actividad de GS en extractos de raíces y hojas de plantas de 6 meses se mantuvo al mismo nivel, tanto en los controles como en aquellas que recibieron un tratamiento de estrés de sequía o salinidad. En tanto que, por el contrario, en aquellos extractos provenientes de raíces u hojas de plantas de 2.5 años, esta actividad disminuye de manera notable durante el desarrollo de los tratamientos, siendo más marcado en el caso del estrés por sequía.

Este comportamiento diferencial (la GS de plantas adultas es sensible al estrés, mientras que la de plantas jóvenes no lo es) podría explicarse de dos maneras. Dado que los niveles de prolina medidos en plantas jóvenes son mucho más elevados que en las plantas adultas, es probable que este metabolito esté actuando como un estabilizador de la actividad enzimática de la GS como ya ha sido demostrado en soya (Paley et al., 1984) y en maíz (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1987).

Por otra parte, es también probable que existan diferencias a nivel molecular entre las GS de plantas jóvenes y adultas de *C. roseus*. En frijol se ha demostrado que existen cambios en la composición de subunidades de la GS a lo largo del crecimiento de la planta (Ortega et al., 1986).

HIPOTESIS

En *Catharanthus roseus*, se han determinado cambios en la actividad enzimática y en los patrones electroforéticos de la glutamino sintetasa, así como la acumulación de metabolitos nitrogenados, tanto a nivel de planta como a nivel de cultivos de células en suspensión, bajo diferentes condiciones medio ambientales como son estrés osmótico, salinidad, sequía y diferentes fuentes nitrogenadas. Es posible, por lo tanto, que la (o las) isoenzima (s) de la GS presenten diferencias en su regulación que les permitan adecuarse a su entorno.

En el presente trabajo, se hizo un estudio sistemático de esta enzima, que comprendió su purificación, caracterización y regulación bajo dos de las condiciones antes mencionadas: sequía y riego con diferentes fuentes nitrogenadas.

METAS

- Purificar y caracterizar las isoenzimas de la glutamino sintetasa de hojas de plantas maduras de *Catharanthus roseus*.
- Determinar el comportamiento de la glutamino sintetasa en plantas control y bajo diferentes fuentes nitrogenadas.
- Determinar los patrones isoenzimáticos de la glutamino sintetasa, tanto en plantas no estresadas como en aquéllas que han sido sometidas a estrés de agua por falta de riego.
- Determinar si los cambios en los patrones isoenzimáticos corresponden a proteínas sintetizadas *de novo* como respuesta al estrés.
- Si no son proteínas sintetizadas *de novo*, determinar si existen modificaciones post-traduccionales que expliquen los cambios en el corrimiento electroforético.

METODOLOGIA

La metodología se encuentra descrita en cada una de las publicaciones.

DISCUSION

Aun cuando se han estudiado de manera amplia las enzimas de las vías de asimilación del amonio en plantas superiores, existen todavía huecos importantes; tal es el caso de las plantas que producen metabolitos secundarios, como por ejemplo *Catharanthus roseus* y *Datura stramonium*, para citar sólo dos casos. Se ha demostrado que en este tipo de plantas, la GS es la vía preferencial de incorporación del amonio a moléculas orgánicas (Platt y Rand, 1982; Probyn y Lewis, 1979). Sin embargo, el conocimiento que de ella se tiene se circunscribe a algún ensayo inmunológico para detectar su presencia en dichas plantas (Botella et al., 1986) o a la medición de su actividad en cultivos *in vitro* de células (Stafford y Fowler, 1983).

Se aislaron dos isoenzimas de la GS, a las que se denominaron GS1 y GS2, siguiendo el orden en que eluyeron de una columna de intercambio iónico (DEAE-Sephadex). De acuerdo a su participación en la actividad total (GS1, 15%; GS2 85%), se podría incluir a *C. roseus* en el grupo C propuesto por McNally et al. (1983), en el cual se encuentran plantas con metabolismo C₃ como arroz, frijol, chícharo y trigo. Debe hacerse notar que otras plantas productoras de metabolitos secundarios, tales como *Nicotiana tabacum*, *Senecio vulgaris* y *Lycopersicum esculentum*, poseen sólo GS2 y por tanto, pertenecen al grupo B.

No se detectaron ritmos circadianos en el comportamiento de la GS a lo largo del día como se ha descrito para raíces de girasol (Knight y Wesissman, 1982) y en hojas de jitomate (Cánovas et al., 1986). Al parecer, los cambios de luz que ocurren durante un día no son de la suficiente magnitud para que den lugar a picos de actividad. Sin embargo, si las plantas se ponen bajo un régimen de oscuridad total durante 5 días, la actividad total de GS disminuye hasta la mitad de la original e incluso la contribución de las isoenzimas cambia radicalmente, i.e. la GS1 contribuye

en mayor proporción que la GS2. Si esta planta se pone ahora bajo luz continua, la recuperación de la actividad y del patrón isoenzimático ocurre dentro de las siguientes 8 horas. La regulación por luz de la actividad de la GS ha sido ampliamente documentada (Edwards y Coruzzi, 1989; Hirel et al., 1982; Gálvez et al., 1990; Schmidt y Mohr, 1989).

Se siguieron esquemas de purificación distintos para cada una de las isoenzimas. En el caso de la GS1, el material del cual se partió fueron hojas maduras; mientras que el caso de la GS2, se aislaron primero los cloroplastos. Después de varios pasos de purificación se obtuvo una preparación de GS1 con un enriquecimiento de 30 veces; sin embargo, al realizar una electroforesis con SDS, se presentaron varias bandas al teñir con azul de Coomassie. La preparación de GS2 presentó un enriquecimiento de casi 100 veces y demostró estar pura a homogeneidad al presentarse sólo una banda después de teñir con nitrato de plata. Las masas moleculares de las isoenzimas son de 46 y 48 kDa, respectivamente; encontrándose entre los rangos determinados para otras especies (McNally y Hirel, 1983).

Durante el proceso de purificación de la GS2, se encontró que la actividad se perdía rápidamente si no había una combinación de agentes reductores de grupos -SH. Es posible que al faltar estos reductores haya formación de grupos disulfuro entre los grupos tiol expuestos en las subunidades de GS (autooxidación), inactivando así a la enzima como ocurre en betabel (Mäck y Tischner, 1990) y en *Lemna minor* (Rhodes et al., 1979).

Se determinó, mediante un sistema complejo de gradientes continuos-discontinuos de sacarosa, la localización intracelular de las isoenzimas de GS. La GS1 se encuentra en el citoplasma, mientras que la GS2 se haya localizada dentro de los cloroplastos. La identidad de la GS2 se determinó por medio de inmunorélicas Western, utilizando anticuerpos específicos contra GS.

Las Km por el glutamato y el ATP muestran grandes diferencias entre las isoenzimas. En el caso del glutamato, la Km aparente de la GS1 es el doble de la presentada por la GS2; para el ATP, la situación es la opuesta, i.e. la GS2 muestra una Km del doble de la determinada para la GS1. Esto último coincide con los estudios cinéticos hechos por Acaster y Weitzmann (1985) en varias plantas. La Km determinada para el ATP de las isoenzimas de GS en *C. roseus* está muy por encima de las encontradas en otras familias; el rango varía de 1 a 15 mM (Acaster y Weitzmann, 1985; Stewart et al., 1980). Sin embargo, el hecho de que la Km para glutamato sea menor en la GS2 aunado a su localización en el cloroplasto, parecerían indicar que esta isoenzima no sólo está involucrada en la asimilación primaria del amonio, sino también en la reasimilación que se lleva a cabo durante la fotorrespiración como se ha determinado en *Lycopersicum esculentum* (Botella et al., 1988).

En lo que se refiere a la inhibición de la actividad de la GS por retroalimentación por aminoácidos, se puede mencionar que, después de probar

aquéllos que han provocado modificaciones de la actividad de esta enzima en otros organismos, no se encontraron diferencias significativas aún a una concentración de 5 mM. Cabe mencionarse que en enzimas relacionadas con la síntesis de esqueletos carbonados, el rango empleado de concentraciones de estos compuestos para obtener un 50% de inhibición es de 10 a 100 μ M (Miflin et al., 1981).

Cuando se determinó la estabilidad térmica de la GS, se encontró que la GS1 resulta ser más resistente a los tratamientos de calor que la GS2. La actividad de la GS2 disminuye rápidamente al aumentar la temperatura: después de 15 minutos a 50°C, solamente queda en solución el 20% de la actividad de esta isoenzima, comparada con el 50% de GS1.

Por otra parte, los estudios hechos con respecto a la necesidad de iones divalentes de las isoenzimas de GS muestran una clara preferencia por el magnesio. Cuando este ión se sustituyó por manganeso, calcio, cobre o cobalto, no fue posible detectar la actividad de las isoenzimas. La concentración determinada para la actividad máxima tanto de GS1 como de GS2 es de 33 mM.

En bacterias gram-negativas, la actividad de la GS está regulada por adenilación reversible de un residuo de tirosina de sus subunidades (Shapiro y Stadtman, 1968; Stadtman y Ginsburg, 1974; Tronick et al., 1973); mientras que en las gram-positivas, se ha demostrado que la glutamino sintetasa no sólo puede regularse por adenilación sino también por fosforilación de sus subunidades (Kimura et al., 1984, 1988).

En plantas superiores, la determinación de que la GS2 está localizada en el cloroplasto (McNally et al., 1983) y de que la GS está codificada por una familia de genes nucleares en chícharo y en frijol (Cullimore et al., 1984; Tingey et al., 1987), sugieren que esta isoenzima debe ser transportada del citosol hacia el cloroplasto. Se ha descrito que varias enzimas de plantas que deben ser trasladadas al cloroplasto están glucosiladas (Sengupta et al., 1981). Sin embargo, en lo que se refiere a la glucosilación de la GS hay datos contradictorios: por una parte, Nato et al. (1984) demostraron que aproximadamente el 5% de la masa molecular de la GS2 de tabaco lo constituyen residuos de carbohidratos; sin embargo, Tingey et al. (1987) utilizando un ensayo de reconocimiento con lectinas no pudieron encontrar residuos glucosilados en la GS.

Puesto que la determinación de una modificación de este tipo podría resultar útil al estudiar la regulación de la GS bajo diferentes condiciones medio ambientales, se decidió utilizar tres estrategias distintas: tinción específica de glucoproteínas, unión a lectinas y desglucosilación enzimática. En el caso de la tinción específica, se utilizó el colorante PAS (ácido peryódico Schiff) después de correr las preparaciones puras de las isoenzimas de GS en geles de SDS-poliacrilamida. Se detectó una banda roja en el caso de GS2, que indica un resultado positivo en la detección de glucoproteínas. Para el ensayo de unión con lectinas, se utilizó Concanavalina A conjugada con peroxidasa. El resultado fue positivo, mostrándose una banda azul en

el filtro de nitrocelulosa que indica una unión exitosa a los residuos glucosídicos de la GS. Los resultados obtenidos para GS1 fueron negativos en ambos casos. Por lo tanto, se determinó que la GS2 de *C. roseus* está glucosilada y contiene una cantidad significativa de residuos de glucosa y manosa.

Para obtener más información sobre la estructura de la cadena glucosídica unida a la GS, se utilizó la endoglucosidasa F de *Streptomyces griseus* (Alting-Mes y Barber, 1986). Después de 18 horas de tratamiento con esta enzima, se presentó un cambio en la masa molecular determinada para GS2, pasando de 48 a 46 kDa. La disminución en la masa molecular y los datos de unión a Concanavalina A nos muestran que la GS2 contiene una cadena lateral rica en manosa por una unión N-glucosídica (el carbohidrato está unido al nitrógeno amido de la asparagina).

En el segundo artículo, se estudió el efecto de diferentes fuentes nitrogenadas en las enzimas involucradas en la asimilación de amonio. Sin embargo, esta discusión se centrará en la GS únicamente. En las raíces, se encontró un aumento de la actividad de esta enzima con los tres tratamientos, siendo más notoria en el caso de la mezcla de amonio y nitrato, donde aumenta diez veces su valor inicial. Sin embargo, esto no ocurre en las hojas, donde en todos los casos hay una disminución de la actividad. El aumento detectado en la actividad de la GS en raíces en presencia de nitrato coincide con los resultados de Vézina y Langlois (1989) en chícharo, sugiriendo que en *C. roseus* existe también una estrecha relación entre el sistema de reducción del nitrato y la asimilación primaria del amonio en este tejido.

Dado que las enzimas del metabolismo nitrogenado responden rápidamente a las fuentes exógenas de nitrógeno, se estudió la respuesta de la GS en un período de ocho horas en explantes de hoja. Un factor que debe tomarse en cuenta al analizar los resultados obtenidos en los explantes es el estrés sufrido al cortar en trozos las hojas; sin embargo, las diferencias en la actividad de la GS parecen deberse principalmente a los tratamientos con las fuentes nitrogenadas. Se encontró un incremento en las primeras cuatro horas con todas las fuentes; sin embargo con nitrato y con la mezcla nitrato-amonio, el aumento en la actividad fue más acusado. Después de las ocho horas, se detectó una notable disminución en las actividades, debida probablemente a una respuesta de senescencia en los explantes.

Basándose en los datos de los aminogramas, se podría sugerir, que ya que en las raíces hay una mayor acumulación de glutamina y glutamato, estos aminoácidos se exportaran a las hojas donde serían reciclados por la acción de las transaminasas y de la glutamato sintasa. Los datos sugieren de nuevo que en las hojas el papel de la GS es llevar a cabo la reasimilación del amonio, producto de la fotorrespiración.

A nivel de la actividad, la GS puede reducirse o incrementarse por la aplicación de amonio o de nitrato dependiendo del material y las condiciones experimentales (Rhodes et al., 1985; Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez, 1986; Vollbrecht et al., 1989). Sin embargo, cuando se eliminan los problemas que acarrea el estudio de la planta intacta, como son la fotorrespiración y el transporte de los iones a largas

distancias, Hayakawa y colaboradores (1990), en un sistema de cultivo de células en suspensión encontraron que existe un paralelismo en el aumento de la actividad de la GS y la cantidad de la proteína específica (polipéptido de 44 kDa) detectada al tratarlo con 10 mM KNO₃. En contraste, la aplicación de amonio no tuvo influencia sobre la cantidad de polipéptido ni sobre la actividad.

Cuando las condiciones medio ambientales cambian, las plantas han de adaptarse a estos cambios de la mejor manera para poder sobrevivir. Se ha estudiado ampliamente la aparición de nuevas proteínas como resultado de los diferentes tipos de estrés; sin embargo, en muy contadas ocasiones se ha llegado a determinar a que enzima o proteína estructural corresponden las manchas que aparecen en las autorradiografías (para citar sólo un ejemplo: Bray, 1990).

Existe solamente un reporte de la aparición de una nueva especie molecular de la fosfoenolpiruvato carboxilasa cuando se aplica un estrés hídrico a *Sedum telephium* (Groenhof et al., 1990).

En el tercer artículo, se describen las modificaciones que sufre la GS cuando las plantas adultas de *C. roseus* están sometidas a dos niveles de estrés hídrico. Ambos niveles fueron caracterizados desde el punto de vista fisiológico y aún en el caso extremo (-3.5 MPa), las plantas podían recobrar completamente su turgidez después de ser regadas.

Como ya se había descrito con anterioridad (Ríos-Chávez, 1987), la actividad de la GS disminuye durante el período de tratamiento de falta de riego. La disminución más marcada se encuentra en las primeras etapas de éste y la actividad se mantiene aproximadamente al 50% de la inicial en etapas posteriores. La contribución de la actividad de las isoenzimas al total cambia de manera sustancial, ya que de ser GS2 la especie preponderante en las plantas control, pasa a estar al mismo nivel que la GS1 en las plantas más estresadas. Esta baja en la actividad se refleja en la cantidad de polipéptido de GS que puede ser detectado mediante un Western Blot: la disminución de la actividad de la GS2 va paralela a una disminución en el péptido de 48 kDa.

La siguiente pregunta a formularse fue si la GS2 sufría algún cambio durante el tratamiento que explicara tanto su disminución de actividad como su desaparición como proteína. Dado que sabemos que la GS2 de las plantas normales está glucosilada y que uno de los papeles biológicos de la glucosilación de proteínas es la protección de péptidos contra ataques proteolíticos, nos avocamos a determinar los cambios en este sentido de dicha isoenzima en las plantas bajo tratamientos de estrés hídrico.

Se detectaron estos cambios utilizando dos estrategias diferentes. La primera fue una tinción específica para glucoproteínas (PAS) y la segunda implica la unión a Concanavalina A. Los resultados de ambas técnicas coinciden en señalar que a medida que aumenta el estrés, la glucosilación detectada para la GS2 disminuye progresivamente. Esto podría sugerir, junto con los datos anteriores de nivel de proteína y de actividad, una explicación sobre lo que le ocurre a la GS durante el

estrés hídrico; i.e. al disminuir su grado de glucosilación, la enzima no puede mantener su conformación biológicamente activa y es más susceptible de ser degradada. Una explicación alternativa podría ser que la pérdida de los residuos de carbohidratos redundara en una disminución de la actividad específica de la GS; así mismo, al cambiar su nivel de glucosilación la proteína podría perder su conformación espacial original, y por consiguiente, el reconocimiento de los epítopes por los anticuerpos sería incompleto.

En resumen, en este trabajo se muestra por primera vez cambios, no sólo a nivel de actividad enzimática sino a nivel de la molécula de proteína, de la enzima fundamental para la incorporación del amonio a moléculas orgánicas: la glutamino sintetasa en condiciones medio ambientales adversas.

BIBLIOGRAFIA

- Acaster M.A. and P.D.J. Weitzman (1985). *FEBS Lett.* 189, 241-244.
- Akimova N.I., Z.G. Evstigneeva and V.L. Kretovich (1976). *Biokhimiya (Moscow)* 41, 1471-1477.
- Altling-Mees M. and B.H. Barber (1986). *Mol. Immunol.* 23, 847-861.
- Atkinson D.E. (1968). *Biochemistry* 7, 4030-4034.
- Bayer E., K.H. Gugel, K. Haegle, H. Hagenmaier, E.S. Esipov, W.A. Koenig and H. Zaehner (1972). *Helv. Chim. Acta* 35, 224-239.
- Blevins D.G. (1989). In *Recent Advances in Phytochemistry* (E.E. Conn, ed), Vol. 23, Plenum, New York, pp. 1-41.
- Bocaud J. and J.P. Billard (1981). *Physiol. Plant.* 53, 558-564.
- Botella J.R., F.M. Cánovas, C. Avila, I. Núñez de Castro and V. Valpuesta (1986). *Plant Physiol.* 82, 585-587.
- Botella J.R., J.P. Verbelen and V. Valpuesta (1988). *Plant Physiol.* 88, 943-946.
- Bray E.A. (1990). *Plant Cell Environ.* 13, 531-538.
- Calza R., E. Huttner, M. Vincentz, P. Rouzea, F. Galangau, H. Vaucheret, I. Cherel, C. Meyer, J. Kronenberger and M. Caboche (1987). *Mol. Gen. Genet.* 209, 552-562.
- Cánovas F.M., C. Avila, J.R. Botella, V. Valpuesta and I. Núñez de Castro (1986). *Physiol. Plant.* 66, 648-652.
- Chapman D.J. and R.M. Leech (1979). *Plant Physiol.* 63, 567-572.

- Cheng C.-L., J. Dewdney, A. Kleinhofs and H.M. Goodman (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6825-6828.
- Crawford N.M., W.H. Campbell and R.W. Davis (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8073-8076.
- Cullimore J.V. and M.J. Bennett (1988). *J. Plant Physiol.* 132, 387-393.
- Cullimore J.V., C. Gebhardt, R. Saarelainen, B.J. Mifflin and R.F. Barker (1984). *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 589-599.
- Cullimore J.V., M. Lara, P.J. Lea and B.J. Mifflin (1983). *Planta* 157, 245-253.
- Cullimore J.V. and B.J. Mifflin (1984). *J. Exp. Bot.* 35, 581-587.
- Dougall D.K. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 683-689.
- Edwards J.W. and G.M. Coruzzi (1989). *Plant Cell* 1, 241-248.
- Emes M. and M.W. Fowler (1979). *Planta* 145, 287-292.
- Eisenberg D., R.J. Almassy, C.A. Jason, M.S. Chapman, S.W. Suh, D. Cascio and W.W. Smith (1987). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52, 483-490.
- Ericson M.C. (1985). *Plant Physiol.* 79, 93-927.
- Ericson M.C. and S.A. Brunn (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 527-531.
- Fluhr R. and N.-H. Chua (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2358-2362.
- Fowler M.W., W. Jessup and G.S. Sarkissian (1974). *FEBS Lett.* 46, 340-342.
- Gálvez S., F. Gallardo and F. Cánovas (1990). *J. Plant Physiol.* 137, 1-4.
- Golova T.P., A.V. Pushkin, V.L. Pushkin, Z.G. Evstigneeva and W.L. Kretovich (1984). *Biochemistry USSR* 49, 508-515.
- Groenhof A.C., N. Smirnof and J.A. Bryant (1990). *Plant Cell Environ.* 13, 437-445.
- Hayakawa T., K. Kamachi, M. Oikawa, K. Ojima and T. Yamaya (1990). *Plant Cell Physiol.* 31, 1071-1077.
- Hirel B., C. Bouet, B. King, D. Layzell, F. Jacobs and D.P.S. Verma (1987). *Embo J.* 6, 1167-1171.
- Hirel B. and P. Gadal (1980). *Plant Physiol.* 66, 619-623.
- Hirel B. and P. Gadal (1981). *Z. Pflanzenphysiol.* 102, 315-319.
- Hirel B., J. Vidal and P. Gadal (1982). *Planta* 155, 17-23.
- Hirel B., C. Weatherley, C. Cretin, C. Bergounioux and P. Gadal (1984). *Plant Physiol.* 74, 448-450.

- Höpfner M., G. Reifferscheid and A. Wild (1988). *Z. Naturforsch.* 43c, 194-198.
- Kanamori T. and H. Matsumoto (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 404-412.
- Kaufman L.S., L.L. Roberts, W.R. Briggs and W.F. Thompson (1986). *Plant Physiol.* 81, 1033-1038.
- Keys A.J., I.F. Bird, M.J. Cornelius, P.J. Lea, R.M. Wallsgrove and B.J. Mifflin (1978). *Nature* 275, 741-743.
- Kimura K., H. Suzuki and Y. Nakano (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1133-1138.
- Kimura K., K. Yagi and K. Matsuoka (1984). *J. Biochem.* 95, 1559-1567.
- Knight T.J. and G.S. Weissman (1982). *Planta* 153, 17-23.
- Ladha J.K., P. Rowell and W.D.P. Stewart (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 688-696.
- Lara M., J.V. Cullimore, P.J. Lea, B.J. Mifflin, A.W.B. Johnston and J.W. Lamb (1983). *Planta* 157, 254-258.
- Lara M., H. Porta, J. Padilla, J. Folch and F. Sánchez (1984). *Plant Physiol.* 76, 1019-1023.
- Lea P.J., R.D. Blackwell, A.J.S. Murray and K.W. Joy (1989) In *Recent Advances in Phytochemistry* (E.E. Conn, ed), Vol. 23, Plenum, New York, pp. 157-189.
- Lea P.J. and B.J. Mifflin (1974). *Nature (London)* 251, 614-616.
- Lee J.A. and G.R. Stewart (1978). *Adv. Bot. Res.* 6, 1-43.
- Loyola-Vargas V.M. and E. Sánchez de Jiménez (1986). *J. Plant Physiol.* 124, 147-154.
- Magasanik B. (1988). *Trends Biochem. Sci.* 13, 475-479.
- Mäck G. and R. Tischner (1990). *Planta* 181, 10-17.
- Mann A.F., P.A. Fentem and G.R. Stewart (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 515-521.
- Mann A.F., P.A. Fentem and G.R. Stewart (1980). *FEBS Lett.* 110, 265-267.
- Maurizi M.R., H.B. Pinkhofsky, P.J. McFarland and A. Ginsburg (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 494-500.
- McNally S. and B. Hirel (1983). *Physiol. Veg.* 21, 761-774.
- McNally S.F., B. Hirel, P. Gadal, A.F. Mann and G.R. Stewart (1983). *Plant Physiol.* 72, 22-25.

- McParland R.H., J.G. Guevara, R.R. Becker and H.J. Evans (1976). *Biochem. J.* 153, 597-606.
- Meister A. (1974). In *The Enzymes* (P.D. Boyer, ed), Vol. 10, Academic Press, New York, pp. 699-754.
- Mifflin B.J. and P.J. Lea (1977). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329.
- Mifflin B.J. and P.J. Lea (1980). In *The Biochemistry of Plants* (B.J. Mifflin, ed), Vol. 5, Academic Press, New York, pp. 169-202.
- Mifflin B.J., R.M. Wallsgrove and P.J. Lea (1981). In *Current Topics in Cellular Regulation*, Vol. 20, Academic Press, New York, pp. 1-43.
- Mills W.R. and K.W. Joy (1980). *Planta* 148, 75-83.
- Miranda-Ham M.L. and V.M. Loyola-Vargas (1987). *J. Plant Physiol.* 129, 169-174.
- Nato F., B. Hirel, A. Nato and P. Gadai (1984). *FEBS Lett.* 175, 443-446.
- O'Neal T.D. and K.W. Joy (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 113-122.
- O'Neal T.D. and K.W. Joy (1974). *Plant Physiol.* 54, 773-779.
- O'Neal T.D. and K.W. Joy (1975). *Plant Physiol.* 55, 968-974.
- Ortega J.L., F. Campos, F. Sánchez and M. Lara (1986). *Plant Physiol.* 80, 1051-1054.
- Paleg L.G., G.R. Stewart and J.W. Bradbeer (1984). *Plant Physiol.* 75, 974-978.
- Platt S.G. and L. Rand (1979). *Plant Cell Physiol.* 23, 917-921.
- Probyn T.A. and O.A.M. Lewis (1979). *J. Exp. Bot.* 115, 299-305.
- Pushkin A.V., L.P. Antoniuk, N.A. Solovieva, V.V. Shubin, Z.G. Evstigneeva, W.L. Kretovich, T.V. Cherednikova, V.L. tsuprun, O.N. Zograf and N.A. Kiselev (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 828, 336-350.
- Pushkin A.V., V.L. Tsuprun, T.Z. Dzhokharidze, Z.G. Evstigneeva and W.L. Kretovich (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 662, 160-162.
- Rakova N.M., L.K. Klyshev and B.K. Kasymbekov (1978). *Fiziologiya Rastenii* 25, 39-43.
- Ríos-Chávez P. (1987). *Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.*
- Rhodes D., G.A. Rendon and G.E. Stewart (1975). *Planta* 125, 201-211.
- Rhodes D., A.P. Sims and G.R. Stewart (1979). In *Nitrogen Assimilation of Plants* (E.J. Hewitt and C.V. Cutting, eds), Academic Press, New York, pp. 501-520.
- Robert F.M. and P.P. Wong (1986). *Plant Physiol.* 81, 142-148.

- Ronzio R.A., W.B. Rowe and A. Meister (1969a). *Biochemistry* 8, 1066-1075.
- Ronzio R.A., W.B. Rowe, S. Wilk, and A. Meister (1969b). *Biochemistry* 8, 2670-2674.
- Schmidt R.R. (1989). In *New Directions in Biological Control, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series*, (R. Baker and P. Dunn, eds), Vol. 112, Alan R. Liss Inc., New York.
- Schmidt S. and H. Mohr (1989). *Planta* 177, 526-534.
- Sengupta C., V. DeLuca, D.S. Bailey and D.P.S. Verma (1981). *Plant Mol. Biol.* 1, 19-34.
- Sims A.P. and A.R. Ferguson (1974). *J. Gen. Microbiol.* 80, 143-158.
- Shapiro B.M. and E.R. Stadtman (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 3769-3771.
- Stadtman E.R. and A. Ginsburg (1974). In *The Enzymes* (P.D. Boyer, ed), Vol. 10, Academic Press, New York, pp. 755-808.
- Stafford A. and M.W. Fowler (1983). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2, 239-251.
- Stewart G.R. and D. Rhodes (1977). *New Phytol.* 79, 257-268.
- Stewart G.R. and D. Rhodes (1978). *New Phytol.* 80, 307-316.
- Stewart G.R., A.F. Mann and P.A. Fentem (1980). In *The Biochemistry of Plants* (B.J. Mifflin, ed), Vol. 5, Academic Press, New York, pp. 271-327.
- Suzuki A., J. Vidal, J. Nguyen and P. Gadal (1984). *FEBS Lett.* 173, 204-208.
- Tate S.S. and A. Meister (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 781-785.
- Tempest D.W., J.L. Meers and C.M. Brown (1970). *Biochem. J.* 117, 405-407.
- Tingey S.V. and G.M. Coruzzi (1987). *Plant Physiol.* 84, 366-373.
- Tingey S.V., E.L. Walker and G.M. Coruzzi (1987). *EMBO J.* 6, 1-9.
- Tingey S.V., F.-Y. Tsai, J.W. Edwards, E.L. Walker and G.M. Coruzzi (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 9651-9657.
- Tronick S.R., J.E. Ciardi and E.R. Stadtman (1973). *J. Bacteriol.* 115, 858-868.
- Tsuprun V.L., T.G. Samsonidze, N.A. Radunika, A.V. Pushkin, Z.G. Evstigneeva and W.L. Kretovich (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 626, 1-4.
- Tsuprun V.L., O.N. Zograf, E.V. Orlova, N.A. Kiselev, A.V. Pushkin, G.E. Shiffelova, N.A. Solovieva, Z.G. Evstigneeva and W.L. Kretovich (1987). *Biochim. Biophys. Acta* 913, 368-376.
- Varner J.E. (1960). *Arch. Biochem. Biophys.* 90, 7-11.
- Varner J.E. and G.C. Webster (1955). *Plant Physiol.* 30, 393-402.

- Vézina L-P. and J.R. Langlois (1989). *Plant Physiol.* 90, 1129-1133.
- Vollbrecht P., E. Klein and H. Kasemir (1989). *Physiol. Plant.* 77, 129-135.
- Wedler F.C., R.B. Denman and W.G. Roby (1982). *Biochemistry* 21, 6389-6396.
- Wedler F.C. and B.R. Horn (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 7530-7538.
- Wedler F.C., B.R. Horn and W.G. Roby (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* 202, 482-490.

Purification and characterization of glutamine synthetase from leaves of *Catharanthus roseus* plants.

Ma. Lourdes Miranda-Ham and Victor M. Loyola-Vargas

División de Biología Vegetal, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Cordemex, Yucatán, México.

(Received for publication January 2, 1992; accepted April 13, 1992)

Miranda-Ham M. L. and Loyola-Vargas. 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase from leaves of *Catharanthus roseus* plants. - Plant Physiol. Biochem. 30:000-000.

As a first step in the molecular characterization of glutamine synthetase (GS) from *Catharanthus roseus* plants under different environmental conditions, two isoenzymes were isolated and purified. They differ markedly in their affinities to glutamate and ATP and in their subcellular locations. It was demonstrated that GS2, the chloroplastic isoenzyme, is glycosylated by three different approaches: glycoprotein staining, binding to lectins and deglycosylation with endoglycosidase F.

Additional key words - Isoenzymes, glycosylation.

M. L. Miranda-Ham (reprint requests) and V. M. Loyola-Vargas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Ap. Postal 87, 97310 Cordemex, Yucatán, México.

Abbreviations. BSA, bovine serum albumin; DEAE, diethylaminoethyl; DTT, dithiothreitol; EDTA, sodium ethylenediaminetetraacetate; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; GS1, cytoplasmic glutamine synthetase; GS2, chloroplastic glutamine synthetase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PAS, periodic acid Schiff stain; SDS, sodium dodecyl sulfate; Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane.

INTRODUCTION

Glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) is one of the most important enzymes involved in ammonium assimilation to organic compounds in higher plants. Ammonium could be derived either from inorganic nitrogen sources or from a number of metabolic processes, such as photorespiration and proteolysis (Mifflin and Lea, 1980).

GS isoenzymes have been described in a wide variety of plant species (McNally and Hirel, 1983). Some of them are associated with specific tissues such as leaves, roots, cotyledons and nodules and with different intracellular compartments: cytoplasm, plastids or chloroplasts (McNally and Hirel, 1983).

Nevertheless, although it has been demonstrated that GS is fundamental for ammonia assimilation to organic compounds in plants which produce secondary metabolites (Probyn and Lewis, 1979; Platt and Rand, 1982), our knowledge about the characteristics and regulation of this enzyme in such plants is scarce. Botella *et al.* (1986), using immunological techniques, found that only the chloroplastic isoenzyme could be detected in the leaves of *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger* and *Nicotiana glauca*.

One of the plants most studied for its capacity of synthesizing secondary metabolites is *Catharanthus roseus*, which produces the alkaloids vinblastine and vincristine, that are currently the best option for the treatment of some types of cancer. These indole alkaloids contain nitrogen atoms

which have their origin in the amino acids tryptophan and serine, whose α -amino groups originate, in turn, from glutamate and glutamine.

In earlier studies, the activity levels of several enzymes of nitrogen metabolism have been estimated: nitrate and nitrite reductases (Loyola-Vargas *et al.*, 1986), glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase (Ríos Chávez *et al.*, 1987), as well as the ammonium, nitrate, nitrite and soluble amino acid pools in different tissues of *C. roseus*.

The above mentioned studies estimated the enzymes and pools in plants not only under ideal growing conditions but also under different nitrogen sources and stress (salinity and drought). The data obtained pointed out to the fact that, as has been shown for other secondary metabolite producing plants, the GS/GOGAT cycle is fundamental for nitrogen assimilation in *C. roseus*.

In the present report, the two GS isoenzymes from the leaves of *C. roseus* plants were isolated and characterized as a first step in the study of the changes (if any) that this enzyme might present as responses to different environmental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Biological material. *Catharanthus roseus* L. Don plants were kept in experimental fields, with a natural photoperiod of 14 h of daylight (800 W m^{-2}) and 10 h of darkness. They were watered daily. Leaves from adult plants were harvested at the peak of the light period and were frozen immediately in liquid nitrogen. Samples were kept at -70°C until processed.

Isolation of GS isoenzymes and purification of GS1. Frozen leaves (35 g) were pulverized in a cold mortar and then homogenized in a Waring blender with 140 ml of 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6), containing 10 mM glutamate, 1 mM MgCl_2 , 10 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM DTT, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5% (w/w) polyvinylpyrrolidone for 2 min. The brei was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at $18,000 \times g$ for 35 min. All procedures were carried out at 4°C . The supernatant was added ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 70% saturation, left to precipitate for 15 min and centrifuged at $16,000 \times g$ for 20 min. The precipitate was dissolved in running buffer [0.05 M Tris-HCl (pH 7.6), containing 1 mM MgCl_2 , 10 mM β -mercaptoethanol and 1 mM DTT] and desalted by ultrafiltration in an Amicon cell (XM 300 membrane). The desalted concentrate was applied to a DEAE-Sephadex column (2.6×20 cm). The column was then washed with four total bed volumes, followed by a 400 ml, linear 0.04 M KCl gradient in buffer. Fractions

(4 ml) were collected at 50 ml h^{-1} and the two peaks of GS activity were pooled separately. The following steps were performed with peak 1. This peak was desalted and concentrated by ultrafiltration. It was then applied to a Sephadex G-200 column (2.6×60 cm) and fractions were collected at 25 ml h^{-1} . Finally, the single peak of activity that eluted from the G-200 column was concentrated and applied to another DEAE-Sephadex column (1×20 cm). The column was washed with four total bed volumes, followed by a 200 ml, linear 0.04 M KCl gradient in buffer. Fractions (3 ml) with GS activity were bulked together and desalted. The purified enzyme was added 20% glycerol and kept at 0°C .

Purification of GS2. Fresh leaves (60 g) were cut into small pieces and homogenized in 240 ml in ice-cold medium (330 mM sorbitol, 50 mM Tricine-KOH, pH 7.9, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , and 0.1% BSA) for 5 s in a waring blender at full speed. The brei was filtered through four layers of cheesecloth and 120 ml were underlayered with 60 ml of Percoll medium (40% v/v Percoll, 330 mM sorbitol, 50 mM Tricine-KOH, pH 7.9 and 0.1% BSA). Chloroplasts were pelleted by centrifugation at $2,500 \times g$ for 3 min in a JS-7.5 rotor (Beckman). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 50 ml of 25 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 1 mM MgCl_2 , 10 mM β -mercaptoethanol and 1 mM DTT. The suspension was finally homogenized for 5 s in a Polytron and centrifuged 20 min at $16,000 \times g$. The supernatant was concentrated in an Amicon cell and then applied on top of a Sephadex column (2.6×20 cm). The column was then washed with two total bed volumes, followed by a 400 ml, linear 0.04 M KCl gradient in buffer. Fractions (4 ml) were collected at 50 ml h^{-1} and those exhibiting GS activity were pooled together and concentrated in an Amicon cell. The single peak that eluted from the column was then applied to a preparative polyacrylamide slab gel. After the run was completed, the well containing the molecular mass markers and a small part of the sample well were silver stained (Wray *et al.*, 1981). The single band of 48 kDa was cut and eluted from the gel in a Mini Protean II electro-eluter. The purified enzyme was aliquoted and kept at 0°C .

Enzyme assay. GS activity (EC 6.3.1.2) was measured as reported by Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez (1986).

Electrophoresis and Western blotting. Proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (Laemmli, 1970) and blotted into nitrocellulose (Towbin *et al.*, 1981). GS proteins were located using an antiserum raised to the nodule alkaline GS isoenzyme of *P. vulgaris* coupling to an alkaline phosphatase conjugated antibody (Sigma).

Periodic acid-Schiff staining. After electrophoresis, the gel was fixed with 12% (w/v) trichloroacetic acid for 30 min. It was then stained as described by Zacharius *et*

al. (1969), using the periodic acid-Schiff kit from Sigma (kit No. 395B).

Concanavalin A blots. The detection of the complexes formed by the interaction of glycoproteins and concanavalin A was performed according to Evans *et al.* (1986), with the following modifications. After electrophoresis, the polypeptides were transferred to a nitrocellulose filter (Millipore, 0.45 μ m). The filter was blocked with Con A buffer [500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5 % (v/v) Tween 20]. It was then transferred to a 1 :1000 dilution of peroxidase conjugated-concanavalin A. To visualize the complexes, color was developed by incubating the filter in the developing solution [to 40 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), add 30 mg 4-chloro-1-naphthol previously dissolved in 10 ml methanol and 60 μ l H₂O₂]. The reaction was stopped by soaking the filter in distilled water.

Deglycosylation of GS2. The deglycosylation reaction was performed as described in Alting-Mees and Barber (1986).

Sucrose gradients. For the determination of the subcellular location of GS activity, the sucrose gradient system described by Leegood and Walker (1988) was employed, but using the following isolation buffer (50 mM Hepes-KOH, pH 8.4, 300 mM sorbitol, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA and 0.1 % BSA). Sucrose was dissolved in the same buffer minus sorbitol. Gradients were centrifuged at 10,000 \times g for 25 min and 2 ml fractions were collected. Glutamate dehydrogenase (NADH-GDH, EC 1.4.1.2), as a marker of mitochondria; Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, 1984), peroxidase (as a marker of peroxisomes; Van den Berg and van Huystee, 1984), glutamine synthetase, chlorophyll (by measuring its absorbance at 652 nm; Arnon, 1949) and proteins were determined in each fraction.

Protein determination. Protein was measuring according to Peterson (1977).

RESULTS

Isolation of GS isoenzymes

The successive steps followed for the purification of glutamine synthetase from *C. roseus* leaves are specified in table 1. Two peaks of GS activity could be isolated after elution from the first DEAE-Sephadex column and were named GS1 and GS2, accordingly (fig. 1). GS2 was predominant and represented about 85 % of the total activity in the extract. During the purification process, there was an absolute requirement for reductants of -SH groups, such as DTT and β -mercaptoethanol, to preserve GS activity. Only in the case of GS1, some other bands could be visualized in the gel when stained with Coomassie blue. GS2 was purified to homogeneity as can be

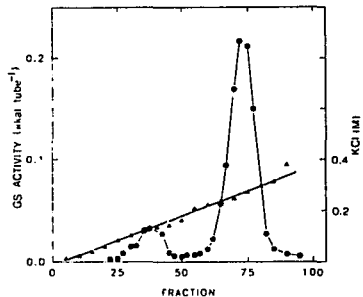


Figure 1. Elution profile of leaf GS activity from a DEAE-Sephadex column after precipitation with ammonium sulfate.

Table 1. Purification of GS1 and GS2 from *C. roseus* leaves.

	Total GS activity (μ kat)	Protein (mg)	Specific activity (μ kat mg ⁻¹ protein)	Purification (fold)
GS1				
Crude extract	13.01	676.6	0.019	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	11.18	242.8	0.046	2.4
DEAE eluate	0.76	10.8	0.07	3.7
G-200 eluate	0.16	0.5	0.313	16.5
DEAE eluate	0.05	0.086	0.58	30.5
GS2				
Isolated chloroplasts	30.42	95.6	0.0053	1
DEAE Sephadex	0.13	2.5	0.052	9.7
Preparative gel	0.022	0.043	0.512	96.5

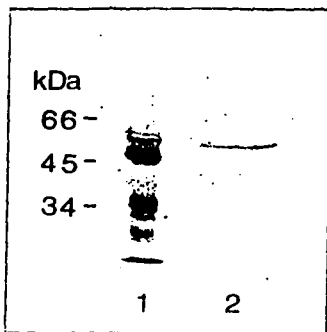


Figure 2. SDS-PAGE of purified GS2, stained with silver nitrate. Lane 1, molecular mass markers and lane 2, GS2 preparation after being eluted from the preparative gel (5 μ g protein).

seen from the silver stained gel shown in figure 2. The molecular mass for GS1 subunit was estimated to be 46 kDa and for GS2, 48 kDa, through comparison with molecular mass markers (fig. 2).

Subcellular location of GS isoenzymes

The subcellular location of the isoenzymes was determined by means of a rather complex continuous-discontinuous system gradient, which

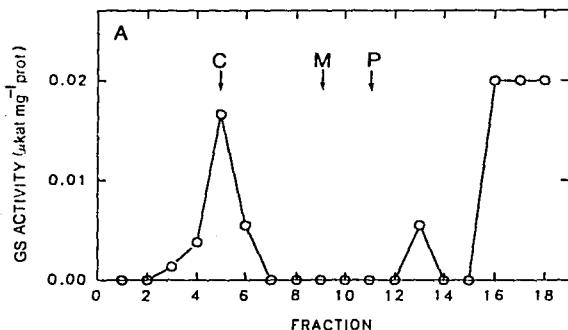
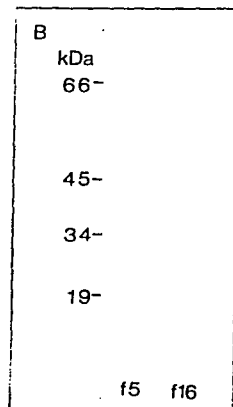


Figure 3. Subcellular location of GS isoenzymes from *C. roseus* leaves. A, Separation of organelles and distribution of GS on a sucrose density gradient. The enzyme markers for mitochondria (M) (NADH-GDH) and peroxisomes (P) (peroxidase) are indicated on top of the figure. B, Western blot analysis of fractions 5 and 16, using *Phaseolus vulgaris* GS antibodies (20 μ g protein).



allowed to separate intact from broken chloroplasts. Three peaks of GS activity could be observed: one on fraction 5, which corresponds to intact chloroplasts, another on fraction 13, broken chloroplasts and a plateau from fraction 15 to 18, corresponding to the cytoplasm (fig. 3A). Western blots of fractions 5 and 16 are shown in figure 3 B. There were several bands that cross-reacted with the GS antibody: the low molecular mass ones could correspond to degradation products, due to the isolation procedure or to soluble components derived from broken organelles.

No circadian rhythm in GS activity of *C. roseus*

In order to determine if there were fluctuations of GS activity during the different hours of the day, leaves from mature plants were collected at different intervals. There was no difference in total GS activity ($23.3 \pm 0.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) or in the relative percentages of GS1 and GS2 (16.1 and 83.9 %, respectively) in leaves harvested at midday or in the darkest period (3 a.m.). Nevertheless, a treatment of complete darkness for 5 days did reduce GS activity by half ($9.21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) and the relative percentage changed (peak 1, 23.6 %; peak 2, 76.3 %).

Substrate affinities

The affinities for glutamate and ATP showed to be quite different for GS1 and GS2. There was a two-fold decrease in affinity in the case of GS1; whereas for ATP, it was almost a two-fold increase.

Nevertheless, the K_m values determined for hydroxylamine are similar in both isoenzymes (tab. 2).

Table 2. Substrate affinities of *C. roseus* leaf glutamine synthetase.

Substrate	K_m (mM)	
	GS-1	GS-2
Glutamate	36.32	15.38
Hydroxylamine	0.63	0.55
ATP	0.52	0.96

Thermal stability

The effect of the temperature on enzyme activity is shown in figure 4. GS1 was stable up to 40°C; beyond this temperature, a continuous decrease in activity was observed. Under identical experimental conditions, GS2 activity diminished markedly between 30°C and 40°C. At 50°C, GS1 still presented 50 % of its original activity, whereas GS2 activity was less than 20 %.

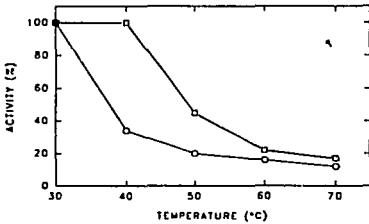


Figure 4. Thermal stability of GS1 and GS2 from *C. roseus* leaves. Samples containing 1.667 nkat mg^{-1} protein of glutamine synthetase were incubated for 15 min at the stated temperatures. After incubation, the samples were kept in ice and activity was measured as mentioned in Material and Methods. (□), GS1; (○), GS2.

Divalent cation requirements

GS activity in the presence of different divalent cations was assayed. When the Mg^{2+} concentration

was varied, a sigmoidal response was observed for GS2. Mg^{2+} concentration for maximal activity was 33 mM. If this ion was substituted for Mn^{2+} , Ca^{2+} or Co^{2+} , no GS activity could be detected.

Effect of amino acids on GS activity

Various amino acids reported to inhibit glutamine synthetase activity were assayed at a 5 mM concentration. No response could be detected when using Ala, Asn, Asp, Arg, Gly, Leu, Lys, Ser or Trp. Note that the concentration employed (5 mM) contrast with those obtained for other enzymes responsible for the synthesis of the carbon skeletons where 50 % inhibition may be achieved in the 10-100 μM (Mifflin *et al.*, 1981).

Glycosylation of GS2

In order to determine whether the GS isoenzymes isolated from *C. roseus* leaves were glycosylated, three different approaches were used. The first one involved a direct stain after electrophoresis for glycoproteins, using PAS stain (periodic acid - Schiff dye), that renders a red staining to bands containing carbohydrate residues; the second one, binding of a lectin to bands transferred to nitrocellulose and the third one, a deglycosylation reaction followed by Western blot. The chosen lectin was Concanavalin A, since in the report of Nato *et al.* (1984), the carbohydrate residues in higher concentrations were glucose, glucosamine and galactosamine. As can be seen in figure 5, only GS2 showed a positive response to a

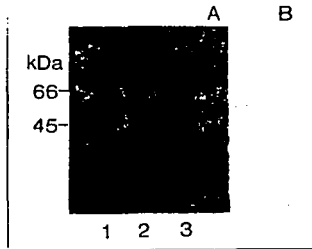
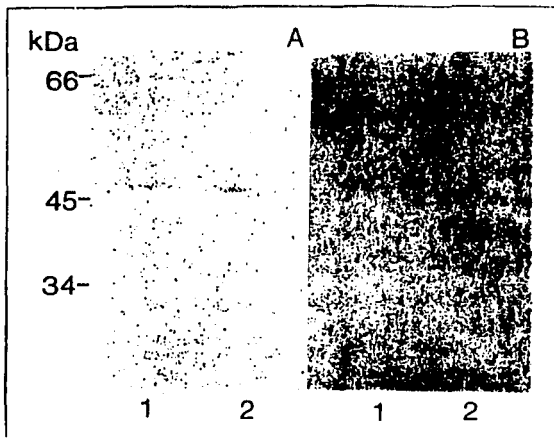


Figure 5. Determination of the presence of carbohydrate residues in the GS2 preparation. A, periodic acid-Schiff staining of the SDS gel: lane 1, positive controls, BSA (66 kDa) and ovalbumine (45 kDa); lane 2, GS1 (10 μg protein), and lane 3, GS2 eluted from the preparative gel (10 μg protein). B, binding of GS2 preparation to peroxidase conjugated-concanavalin A.

Figure 6. Deglycosylation of GS2 using endoglycosidase F for 18 h. A, western blot analysis. B, periodic acid-Schiff staining of the gel. Lane 1, GS2 prior to the hydrolysis reaction (10 µg protein) and lane 2, deglycosylated GS2 (10 µg protein).



specific glycoprotein stain (PAS stain) and to Concanavalin A binding. The GS1 preparation, was run side by side to that of GS2, did not present any red stained band, nor did develop the colour reaction that implied a binding of the lectin.

GS2 was deglycosylated using endoglycosidase F for 18 h. After this treatment, both the GS2 preparation and the deglycosylated one were run in an SDS-gel and transferred to a nitrocellulose membrane. To identify the band corresponding to the GS subunit, an specific GS antiserum was used. There was shift in the molecular mass of the band from 48 kDa to 46 kDa (fig. 6A). A portion of this gel was stained with PAS, showing a red colored band in the lane of the GS2 preparation and none in that corresponding to the deglycosylated protein (fig. 6B).

DISCUSSION

Two isoenzymes of glutamine synthetase have been isolated from *C. roseus* leaves. GS1 corresponds to the cytoplasmic isoenzyme and GS2 has a chloroplastic location. GS2 has been further purified, showing it to be a probable octamer with subunits of 48 kDa and a total dependence on reductants of -SH groups for activity. This depen-

dence on reductants suggests a possible regulation by the chloroplastic redox states (Buchanan, 1980).

Though it has been shown that GS activity seems to change in a circadian fashion during the day in sunflower and tomato (Knight and Weissman, 1982; Canovas *et al.*, 1986), the data obtained in *C. roseus* leaves suggest that light changes that occur through the day are not sufficient to induce a change either in total GS activity or in the isoenzyme pattern. It was clear that longer periods of darkness do have a deleterious effect on GS2 activity, since it has been demonstrated in several species that glutamine synthetase is under regulation by light (Hirel *et al.*, 1982; Edwards and Coruzzi, 1989; Schimdt and Mohr, 1989; Gálvez *et al.*, 1990, to cite a few).

The relative percentages of activity of the two isoenzymes place *C. roseus* among those plants with less than 30 % of total activity as GS1 activity (group C; McNally *et al.*, 1983). In this group of plants, the reassimilation of ammonia released during photorespiration cannot be completely fulfilled by GS1. Consequently, it seems likely that, based on the Km values displayed for glutamate, ATP and hydroxylamine, GS2 could function in the primary ammonia assimilation in the chloroplast and also in the reassimilation of the ammonia released during the decarboxylation of glycine to serine.

Feedback inhibition by amino acids has been known to occur in some plants (McNally and Hirel, 1983) but in most cases, the amount of inhibition has generally been less than complete and the concentrations of amino acids required have been large. No such effect upon the addition of several amino acids could be detected in the isolated GS isoenzymes.

The determination that GS2 has a chloroplast localization (McNally *et al.*, 1983) and that GS is encoded by a family of nuclear genes in pea and French bean (Cullimore *et al.*, 1984; Tingey *et al.*, 1987) suggest that this isoenzyme may be transported from the cytosol into the chloroplast. It has been reported that many plant proteins that are transported from one compartment to another are glycosylated (Sengupta *et al.*, 1981). Since in the case of GS there had been contradictory reports - GS2 from tobacco leaves was shown to contain carbohydrates up to 5 % of their total molecular mass (Nato *et al.*, 1984), whereas Tingey *et al.* (1987) reported after using lectin binding techniques that the pea GS2 polypeptide did not contain glycosyl residues - it was decided to determine if GS isoenzyme of *C. roseus* is thus modified, using three different approaches: a direct glycoprotein stain, binding assay to concanavalin A and deglycosylation of the protein using endoglycosidase F. The results for the first two approaches were positive: a red band, corresponding to the molecular mass of GS2 subunit, was found after using the PAS dye and a blue band, that indicates the successful binding of concanavalin A to glycosidic residues in the GS2 subunit. Thus, *C. roseus* GS2 is glycosylated and there are clear evidences, based on the lectin binding assay, that it contains significant amounts of mannosyl and glucosyl residues.

Information on the type of the glycosidic chain attached to GS could be obtained from the third approach (Alting-Mees and Barber, 1986). The shift in molecular mass which results from the deglycosylation of GS2 using endoglycosidase F and the positive results of the binding of Concanavalin A point out to the fact that GS2 contains an N-linked high mannose type side chain.

Acknowledgements. The authors wish to acknowledge the kind gift of *Phaseolus vulgaris* antibodies from Drs. M. Bennett/J. V. Cullimore and M. Lara and the technical advice of Q. B. B. Blondy Canto. This work was financially supported by National Council for Science and Technology Improvement (Mexico), by Grant No. P228CCOX880121.

REFERENCES

- Alting-Mees M. and Barber B. H., 1986. - A structural analysis of the carbohydrate side chains on class I and class II histocompatibility antigens of the swine facilitated by heteroantiseria specific for the denatured polypeptides. *Mol. Immunol.*, 23, 847-861.
- Arnon D. I., 1949. - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Botella J. R., Cánovas F. M., Avila C., Núñez de Castro I. and Valpuesta V., 1986. - Immunochemical comparison of glutamine synthetases from some Solanaceae plants. *Plant Physiol.*, 82, 585-587.
- Buchanan B. B., 1980. - Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, 341-374.
- Cánovas F. M., Avila C., Botellas J. R., Valpuesta V. and Núñez de Castro I., 1986. - Effect of light-dark transition on glutamine synthetase activity in tomato leaves. *Physiol. Plant.*, 66, 648-652.
- Cullimore J. J., Gebhardt C., Saarelainen R., Mifflin B. J., Idler K. B. and Barker R. F., 1984. - Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. Organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Genet.*, 2, 589-599.
- Edwards J. W. and Coruzzi G. M., 1989. - Photorespiration and light can act to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell*, 1, 241-248.
- Evans E. A., Gilmore R. and Blobel G., 1986. - Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 581-585.
- Galvez S., Gallardo F. and Cánovas F., 1990. - The occurrence of glutamine synthetase isoenzymes in tomato plants is correlated to plastid differentiation. *J. Plant Physiol.*, 137, 1-4.
- Hirel B., Vidal J. and Gadal P., 1982. - Evidence for a cytosolic-dependent light induction of chloroplast glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. *Planta*, 153, 17-23.
- Knight T. J. and Weisman G. S., 1982. - Rhythms in glutamine synthetase activity, energy charge and glutamine in sunflower roots. *Plant Physiol.*, 70, 1683-1688.
- Laemmli U., 1970. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leegood R. C. and Walker D. A., 1988. - Chloroplasts. In *Isolation of membranes and organelles from plant cells*, Hall J. L. and Moore A. L., ed., Academic Press, London, 185-210.
- Loyola-Vargas V. M. and Sánchez de Jiménez E., 1984. - Differential role of glutamine dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.*, 76, 536-540.
- Loyola-Vargas V. M. and Sánchez de Jiménez E., 1986. - Regulation of glutamine synthetase/glutamate syn-

- these cycle in maize tissues. Effect of the nitrogen source. *J. Plant Physiol.*, 124, 147-154.
- Loyola-Vargas V. M., Gómez I., López M. E., J. Reyes and Robert M. L., 1986. - Changes in the activities of the enzymes involved in nitrogen metabolism in *Catharanthus roseus* L. plants grown in different nitrogen sources. *Can J. Bot.*, 64, 2052-2060.
- McNally S. and Hirel B., 1983. - Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Vég.*, 21, 761-774.
- McNally S., Hirel B., Gadal P., Mann A. F. and Stewart G. R., 1983. - Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol.*, 72, 22-25.
- Mifflin B. J. and Lea P. J., 1980. - Ammonia assimilation. In *The biochemistry of plants*, 5, Stumpf P. K. and Conn E. E., ed., Academic Press, New York, 169-204.
- Mifflin B. J., Wallsgrove R. M. and Lea P. J., 1981. - Glutamine metabolism in higher plants. *Curr. Topics Cell. Reg.*, 20, 1-43.
- Nato F., Hirel B., Nato A. and Gadal P., 1984. - Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. *FEBS Lett.*, 175, 443-446.
- Peterson G. L., 1977. - A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83, 346-356.
- Platt S. G. and Rand L., 1982. - Methionine sulfoximine effects on C₄ plant leaf discs: comparison with C₃ species. *Plant Cell Physiol.*, 23, 917-921.
- Probyn T. A. and Lewis O. A. M., 1979. - The route of nitrate-nitrogen assimilation in the root of *Datura stramonium* L. *J. Exp. Bot.*, 115, 299-305.
- Ríos-Chávez P., Robert M., Reyes J., Oropeza C. and Loyola-Vargas V. M., 1987. - GDH and GS behaviour in *Catharanthus roseus* under stress. *Plant Physiol.*, 83, 49s.
- Schmidt S. and Mohr H., 1989. - Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. *Planta*, 177, 526-534.
- Sengupta C., DeLuca V., Bailey D. S. and Verma D. P. S., 1981. - Post-translational processing of 7S and 11S components of soybean storage proteins. *Plant Mol. Biol.*, 1, 19-34.
- Tingey S. V., Walker E. L. and Coruzzi G. M., 1987. - Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.*, 6, 1-9.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon V., 1981. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- Van den Berg B. and van Huystee R. B., 1984. - Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase from *Petunia*. *Physiol. Plant.*, 60, 299-304.
- Way W., Boulikas T., Wray V. P. and Hancock R., 1981. - Silver staining of protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 118, 197-205.
- Zacharius R. M., Zell T. E., Morrison J. H. and Woodlock J. J., 1969. - Glycoproteins staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 30, 148-152.

Sometido en Journal of Plant Physiology.

**Effect of inorganic nitrogen on ammonium assimilation enzymes of
Catharanthus roseus plants**

**María de Lourdes Miranda-Ham, Irene Gómez and Víctor Manuel
Loyola-Vargas***

**Departamento de Bioquímica, División de Biología Vegetal, Centro
de Investigación Científica de Yucatán, Ap. Postal 87, 97310 Cordemex,
Yucatán, México.**

*** To whom correspondence should be addressed.**

Summary

The activities of the enzymes glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2), glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) and glutamate synthase (EC 1.4.1.14) were measured in leaves, roots and leaf explants of *Catharanthus roseus* grown in different nitrogen sources: water (control), 20 mM KNO₃, 2 mM NH₄Cl and a mixture of the two latter ones.

In the roots, glutamate dehydrogenase activity is four-fold higher than in leaves and it is also higher than the activities of glutamine synthetase and glutamine synthase. The aminative and deaminative GDH activities are regulated differentially depending on the nitrogen source and the studied tissue.

Ferredoxin dependent glutamate synthase was detected only in photosynthetic tissues but not in the roots, where the NADH dependent enzyme was found.

Substantial qualitative differences were detected in the amino acid pools of roots under the different nitrogen conditions, while little variation occurred in the leaves. Gamma-aminobutyric acid was present in large amounts in both tissues and could represent an important store of organic nitrogen.

The nitrogen sources substantially modified the alkaloid content; with nitrate producing an increment of 50%, while a mixture of nitrate and ammonium produced a decrease of 45%.

Key words: *Catharanthus roseus*, glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, glutamine synthetase, nitrogen source.

Introduction

Ammonium can be incorporated to organic compounds by two alternative pathways in most organisms (Mifflin and Lea, 1980). These are the glutamate pathway catalyzed by glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2, GDH), and the glutamine pathway mediated by glutamine synthetase (EC 6.3.1.2, GS) and glutamate synthase (EC 1.4.1.14, GOGAT).

Although the enzymes involved in this process have been thoroughly characterized in plants of agricultural importance (Berkum and Sloger, 1981; Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, 1984, 1986a, 1986b) or in particular models, such as glycophytes (Rhodes et al., 1980), halophytes (Stewart and Rhodes, 1978), cultured cells (Dougall, 1977; Mohanty and Fletcher, 1980; Murillo and Sánchez de Jiménez, 1984), or detached plant organs (Lewis and Probyn, 1978; Probyn and Lewis, 1979), very little attention has been given to the nitrogen assimilation pathways of plants that synthesize secondary metabolites. In our particular case, the only report that has been published in *Catharanthus roseus* is that of Stafford and Fowler (1983). Furthermore, as Stewart and Rhodes (1977a) have emphasized, it may prove difficult to extrapolate the results obtained with cultured cells or with lower plants to plants showing a higher degree of tissue differentiation.

In a previous study we reported that nitrate reductase and nitrite reductase have completely different activities in root and leaf tissues of *C. roseus* and that only the activity of root nitrite reductase seems to be modified by the nitrogen source. The amino acid contents were also significantly affected by the different nitrogen sources, not only in the whole plant but also in *in vitro* studies using leaf explants. These results suggest that modifications in the activities of the enzymes involved in the assimilation of ammonium to organic compounds, i.e. GS, GOGAT and GDH, could partially explain the differences in the amino acid pools (Loyola-Vargas et al., 1986).

The present report is concerned with the effect of different nitrogen sources on the activities of GDH, GS and GOGAT, on the amino acids profiles and on the alkaloid content in the leaves and roots of *C. roseus*.

Materials and Methods

Plant growth conditions. *Catharanthus roseus* L.G. Don were grown in separate pots with soil in a growth room at 32°C with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. The plants were divided into four groups of 50. Each plant was watered every other day with one of the following solutions: group 1, water (control; the ammonium concentration in the soil was 1 μmol/g dry soil and the nitrate concentration was 10 μmol/g dry soil); group 2, 20 mM KNO₃; group 3, 2 mM NH₄Cl; and group 4, 20 mM KNO₃ plus 2 mM NH₄Cl.

For the experiments using explants, 10 leaves of the same physiological age were cut 3 h after the beginning of the light period and placed in Erlenmeyer flasks containing 50

ml of the above mentioned solutions. The leaves were incubated for 2, 4 and 8 h in continuous light.

Enzyme extracts. The tissues were frozen at -70°C , ground with a pestle and mortar and then homogenized with a Waring blender in 2.5 volumes (w/v) of extraction buffer containing 5% polyvinylpyrrolidone (w/w). The extraction buffer for GDH, GS and NADH-GOGAT contained 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM CaCl_2 , 5 mM 2-mercaptoethanol; for ferredoxin-GOGAT, it contained 50 mM phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol. The homogenates were filtered through four layers of cheesecloth and the filtrates centrifuged at $14,000 \times g$ for 30 minutes. The supernatants were used to determine enzyme activities.

Determination of enzyme activities. Aminative and deaminative GDH activities were assayed according to Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez (1984). GS, NADH-GOGAT and Fd-GOGAT were measured as reported previously by Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez (1986a).

Amino acid analysis. The amino acid analysis were performed in a Durrum D-500 amino acid analyser, which employs the method of Lee (1974) for the formation of the buffer gradient and the method of Moore (1968) for the ninhydrin reaction.

Alkaloid extraction. The total alkaloids were extracted following the method reported by Kutney et al. (1980).

Protein determination. The concentration of protein was determined by the method reported by Peterson (1977) using bovine serum albumin as a standard.

Results and Discussion

The activity of GDH was measured in both the aminative and deaminative pathways in plants watered with the different nitrogen sources (Table 1). NADH-GDH activity in the root decreased 50% only in the presence of ammonium; while in the leaves, it was not affected by any of the nitrogen sources. NAD-GDH activity showed a marked increase in roots growing in a mixture of nitrate and ammonium; whereas only minor variations could be observed in leaf tissues. These data suggest, as has been previously observed for GDH in maize (Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, 1984) and the algae *Scenedesmus acutus* (Shatilov and Sund, 1983), that the aminative and deaminative activities of GDH are regulated differentially. This effect could be due to the presence of conformational isomers or isoenzymes.

GS activity in the roots increased with all added nitrogen sources: it doubled when the plants were supplemented with ammonium, increased almost six-fold with nitrate and ten-fold when given the mixture (Table 1). In the leaves, GS activity was always higher than that found in the roots; yet it was reduced in all nitrogen conditions, with ammonium

alone producing the lowest activity. Stafford and Fowler (1983) found that two different levels of nitrate produced no effect on the activity of this enzyme in *C. roseus* cells cultivated *in vitro*, and thus suggested that the regulation of GS was not dependent on nitrate availability in the media. This finding contrast with the marked nitrate dependence shown by GS activity in both roots and leaves (Table 1).

GOGAT activity extracted from roots was NADH-dependent and unable to use methyl viologen as an electron donor; while the opposite occurred in leaf tissues. NADH-GOGAT activity decreased to half its initial value when the plants were grown either in the presence of nitrate or ammonium, but showed a two-fold increase when the plants were exposed to the mixture. All the nitrogen sources produced an increase in Fd-GOGAT activity in the leaves. This high activity level could be partially explained by the conversion to glutamate of glutamine, that was synthesized in the roots as a result of the increment of GS activity by all the nitrogen sources (Table 1).

The very low activity of GDH, compared to those of GS and GOGAT, in the leaves of plants grown without nitrogen supplement suggests a minor role for GDH in the assimilatory process of NH_4 in photosynthetic tissues. However, in the roots of the same plants, GDH activity is higher than those of GS and GOGAT, and also higher than the one found in the leaves, which suggests a special role for GDH in these tissues. The importance of GDH in the roots is further stressed by the ratios of the activities of the three enzymes under the different nitrogen sources. The GDH/GS ratio has a value of 16 in roots; while in the leaves, this ratio is only 0.24. A similar behaviour has been observed in maize (Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, 1986a) and *Bouvardia ternifolia* (Sánchez de Jiménez and Fernández, 1983). The difference between the GDH/GS ratios suggests different functions for the GS/GOGAT cycle in different tissues. The high GOGAT activity in leaves could be attributable to the fact that this enzyme plays an important role in the recycling of ammonia (Platt and Tand, 1982), or that it helps in the export of reducing equivalents from the chloroplast. It is possible that the energy charge of the cell is responsible for this status, since it is known that ATP inhibits glutamate dehydrogenase and stimulates glutamine synthetase (Stewart and Rhodes, 1977b; Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, unpublished data).

Although recent studies have demonstrated that GDH's contribution to ammonia assimilation is only minor (for a review, see Rhodes et al., 1989), our results and those cases reviewed in Srivastava and Singh (1987) further support the idea, first emphasized by Oaks and Hirel (1985), that under certain conditions GDH could play an important role in nitrogen assimilation in the roots.

We have found that *C. roseus* plants grown in the presence of nitrate or ammonium have a higher amino acid content compared to those watered only with water. Moreover, amino acid levels are particularly high in the roots (Loyola-Vargas et al., 1986). Therefore, the composition of amino acid pool in extracts of root and leaf tissues was analyzed (Table 2).

The total amino acid pool in roots was always higher than in the leaves. In the roots, the amino acid pool was both qualitatively and quantitatively affected by the different

nitrogen treatments. The most significant differences were the increase in γ -aminobutyric acid (GABA) and histidine when the plants were grown with nitrate and unlike GABA, histidine levels dropped when nitrate was absent. In leaf tissues only a minor accumulation of alanine occurred in the presence of ammonium.

In general, in roots the enzyme activities increased in the following order: GS>GDH> GOGAT except in the case of the mixture of nitrate plus ammonium. In the leaves the order was always GOGAT>GS>GDH suggesting that glutamine could be synthesized in the roots and transported to the leaves where the elevated activity of Fd-GOGAT converts it to glutamate which accumulates in this tissue (Table 2). However, the glutamate pool could have another origin: GABA, which produces glutamate and alanine through the action of transaminases (for a review, see Givan, 1980). These amino acids also showed a small accumulation in the leaves (Table 2).

Since some of the nitrogen metabolism enzymes respond very quickly to external nitrogen sources, we also studied the nitrogen metabolism in leaf explants over a period of 8 hours. When the explants were incubated in water, the activities of both NADH-GDH and NAD-GDH slowly decreased over the 8 hour period, with the aminative activity disappearing more rapidly (Figure 1A). This further supports the fact that these two activities could be differentially regulated as it occurs in the whole plant. The extracts from explants that were given a source of nitrogen showed an increased activity over the first four hours followed by a rapid decrease (Figure 1B-D).

In the presence of ammonium, the activity of GS increased rapidly over the first four hours and then decreased again to levels below the original activity (Figures 2C and D); whereas in the control explants, it showed the opposite effect (Figure 2A). The activity of GOGAT decreased in extracts of tissues incubated in water and in ammonium. However, in the case of the latter, the enzyme returned to its basal levels after 8 hours. Only with nitrate alone did GOGAT show some increase over the first four hours before falling to its original level.

The increase in the total amino acid pool measured in leaf explants after incubation in ammonium or in the ammonium-nitrate mixture correlates well with an increase in the activities of NADH-GDH and GS (Loyola-Vargas et al., 1986). However, this increase in amino acid pools could also be due to the aging of the tissue.

The results presented here show that *Catharanthus roseus* possesses all the enzymes involved in ammonia assimilation and that they are modified by exogenous sources of nitrogen. The response in the leaves differs from that in the roots, determining which amino acids accumulate. In the roots, the GS/GOGAT cycle works mainly in the synthesis of glutamine for export. The substrate for this enzyme could be provided by GDH, as suggested by the fact that GDH activity is four-fold higher in roots than in leaves (Table 1).

Since the indole alkaloids, which are of great economic interest, are derived from the primary pathways of amino acid metabolism, we consider it necessary to understand

how these are regulated and how this regulation could affect the secondary pathways leading to these compounds.

Figure 3 shows that nitrate produced an increase of 50% in the alkaloid content while the mixture of nitrate and ammonium reduced the alkaloid content by 45%. These data, along with the determined enzymatic activities might suggest a link between nitrogen assimilation and the pathways for the synthesis of secondary metabolites if we consider that both of the nitrogen molecules in these alkaloids come from tryptophan and serine, which in turn come from glutamine and glutamate.

Acknowledgements. Supported by National Council for Science and Technology Improvement (México), by Grant No. P228CCOX880121. The authors wish to thank F. Zamudio for performing the amino acid analysis.

References

- Berkum, P. V. and C. Sloger: Ontogenic variation of nitrogenase, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in *Oriza sativa*. *Plant Physiol.* 68, 722-726 (1981).
- Dougall, D.K.: Current problems in the regulation of nitrogen metabolism in plant cell cultures. In: Barz, W., E. Reinhard and M.H. Zenk (eds.): *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, 76-84. Springer Verlag, Berlin (1977).
- Givan, C.V.: Aminotransferases in higher plants. In: Mifflin, B.J. (ed.): *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5, 329-357. Academic Press, New York (1980).
- Kutney, J.F., L.S.L. Choi, P. Kolodziejczyk, S.K. Sleigh, K.L. Stuart, B.R. Worth, W.G.W. Kurz, K.B. Chatson and F. Constabel: Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures: isolation and characterization of alkaloids from one cell line. *Phytochem.* 19, 2589-2595 (1980).
- Lee, P.Y.L.: Single-column system for accelerated amino acid analysis of physiological fluids using five lithium buffers. *Biochem. Med.* 10, 107-121 (1974).
- Lewis, A.O.M. and T.A. Probyn: ^{15}N incorporation and glutamine synthetase inhibition studies of nitrogen assimilation in leaves of the nitrophyte, *Datura stamonium* L. *New Phytol.* 81, 519-526 (1978).
- Loyola-Vargas, V.M. and E. Sánchez de Jiménez: Differential regulation of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.* 76, 536-540 (1984).
- Loyola-Vargas, V.M. and E. Sánchez de Jiménez: Regulation of glutamine synthetase/glutamate synthase cycle in maize tissues. Effect of the nitrogen source. *J. Plant Physiol.* 124, 147-154 (1986a).
- Loyola-Vargas, V.M. and E. Sánchez de Jiménez: Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth on maize. *J. Plant Physiol.* 125, 235-242 (1986b).
- Loyola-Vargas, V.M., I. Gómez, M.E. López, J. Reyes and M.L. Robert: Changes in the activities of the enzymes involved in nitrogen metabolism in *Catharanthus roseus* L. plants grown in different nitrogen sources. *Can. J. Bot.* 64, 2052-2060 (1986).
- Mifflin, B.J. and P.J. Lea: Ammonia assimilation. In: Stumpf, P.K. and E.E. Conn (eds.): *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5, 169- 204. Academic Press, New York (1980).

Mohanty, B. and J.S. Fletcher: Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Physiol. Plant.* 48, 453-459 (1980).

Moore, S.: Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.* 243, 6821-6823 (1968).

Murillo, E. and E. Sánchez de Jiménez: Alternative pathways for ammonium assimilation in *Bouvardia ternifolia* cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 117, 57-68 (1984).

Oaks, A. and B. Hirel: Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 345-365 (1985).

Peterson, G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356 (1977).

Platt, S.G. and L. Rand: Methionine sulfoximine effects on C₄ plant leaf discs: comparison with C₃ species. *Plant Cell Physiol.* 23, 917-921 (1982).

Probyn, T.A. and O.A.M. Lewis: The route of nitrate-nitrogen assimilation in the root of *Datura stramonium* L. *J. Exp. Bot.* 115, 299-305 (1979).

Rhodes, D., D.G. Brunk and J.R. Malgahaes: Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase?. In: Poulton, J.E., J.T. Romeo and E.E. Conn (eds.): *Recent Advances in Phytochemistry, Plant Nitrogen Metabolism*, Vol. 23, 191-225. Plenum Press, New York (1989).

Rhodes, D., P.A. Sims and B.F. Folkes: Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor*. *Phytochem.* 19, 357-365 (1980).

Sánchez de Jiménez, E. and L. Fernández: Biochemical parameters to assess cell differentiation of *Bouvardia ternifolia*. *Planta* 158, 377-383 (1983).

Shatilov, V.R. and H. Sund: Glutamate dehydrogenase of the unicellular alga *Scenedesmus acutus*. *Planta* 157, 367-370 (1983).

Srivastava, H.S. and R.P. Singh: Role and regulation of L- glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochem.* 26, 597-610 (1987).

Stafford, A. and M.W. Fowler: Effect of carbon and nitrogen limitation upon nutrient uptake and metabolism in batch of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2, 239-251 (1983).

Stewart, G.R. and D. Rhodes: Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. In: Smith, H. (ed.): Regulation of Enzymes Synthesis and Activity, 1-22. Academic Press, London (1977a).

Stewart, G.R. and D. Rhodes: A comparison of the characteristic of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna minor*. New Phytol. 79, 41-54 (1977b).

Stewart, G.R. and D. Rhodes: Nitrogen metabolism of halophytes. III. Enzymes of ammonia assimilation. New Phytol. 80, 307-316 (1978).

TABLE 1. Enzyme activities in *C. roseus* plants watered with different nitrogen sources, expressed as nmol of transformed substrate/min mg protein. Data shown are the mean of three independent experiments, each using 50 plants.

TREATMENT

	ROOTS			
	NADH-GDH	NAD -GDH	GS	NADH-GOGAT
NONE	1583 ± 75	165 ± 16	94 ± 3	112 ± 34
NITRATE 20 mM	1773 ± 124	159 ± 13	587 ± 40	55 ± 22
AMMONIUM 2 mM	736 ± 29	117 ± 8	225 ± 18	44 ± 16
NITRATE 20 mM PLUS AMMONIUM 2 mM	1847 ± 92	388 ± 31	996 ± 55	229 ± 13

	LEAVES			
	NADH-GDH	NAD -GDH	GS	Fd-GOGAT
NONE	412 ± 25	99 ± 5	1747 ± 87	468 ± 18
NITRATE 20 mM	424 ± 13	78 ± 2	1318 ± 79	874 ± 43
AMMONIUM 2 mM	487 ± 28	189 ± 13	978 ± 68	1426 ± 99
NITRATE 20 mM PLUS AMMONIUM 2 mM	432 ± 30	125 ± 14	1458 ± 87	2691 ± 242

TABLE 2. Amino acid content in roots and leaves of plants grown in different nitrogen sources.

TREATMENT	AMINO ACIDS (umoles/g FW)										
	GABA	His	Lys	Asx	Glx	Leu	Tyr	Phe	Arg	Ala	TOTAL
ROOTS											
NONE	8.2	17.8	17.2	-	-	-	-	-	-	-	43.2
NITRATE 20 mM	17.2	44.9	5.6	36.7	5.4	3.8	4.7	6.7	1.7	-	126.7
AMMONIUM 2 mM	13.1	-	3.7	-	8.7	-	-	-	8.7	-	18.2
NITRATE 20 mM PLUS AMMONIUM 2 mM	12.5	43.2	3.9	27.3	4.7	8.6	2.4	-	2.7	8.2	97.5
LEAVES											
NONE	4.9	-	-	-	5.4	-	-	-	-	-	18.3
NITRATE 20 mM	6.8	1.7	-	-	3.2	-	1.3	-	-	-	12.2
AMMONIUM 2 mM	4.3	-	-	-	2.4	-	1.4	-	-	8.2	8.3
NITRATE 20 mM PLUS AMMONIUM 2 mM	6.1	-	-	-	4.4	-	1.7	-	-	8.4	12.6

(-) Not detected. The method's sensitivity is 1 nmol.

Asx = Asp + Asn; Glx = Glu + Gln

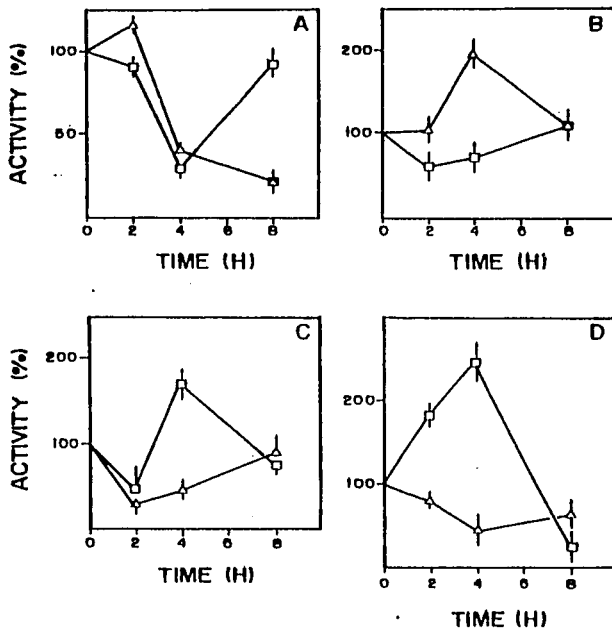


Figure 1. NADH-GDH (Δ) and NAD⁺-GDH (\square) activities in leaf explants incubated in 50 ml of water (A), 20 mM KNO₃ (B), 2 mM NH₄Cl (C) and 20 mM KNO₃ + 2 mM NH₄Cl (D). NADH-GDH activity at time zero were 437 (A), 405 (B), 460 (C) and 426 (D) nmoles NADH min⁻¹ mg protein⁻¹ and for NAD⁺-GDH were 76 (A), 85 (B), 98 (C) and 105 (D) nmoles NADH min⁻¹ mg protein⁻¹. Time zero was taken as 100%. Each value is the mean \pm SE of three independent experiments.

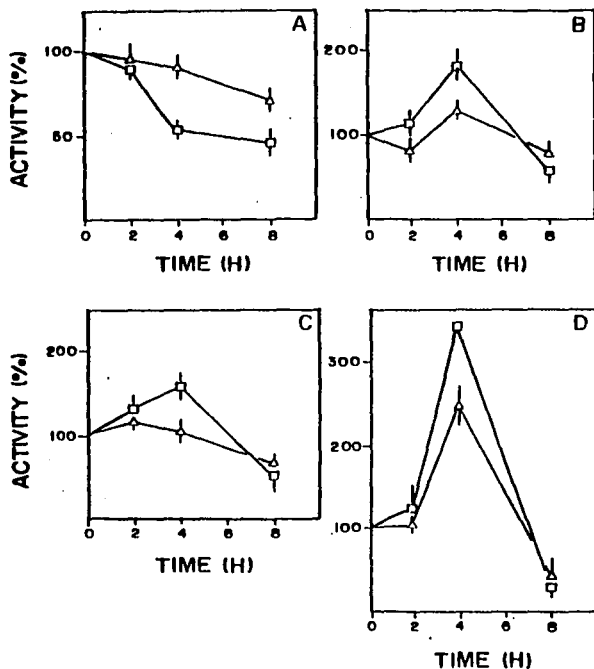


Figure 2. GS (□) and Fd-GOGAT (Δ) activities in leaf explants incubated in 50 ml of water (A), 20 mM KNO₃ (B), 2 mM NH₄Cl (C) and 20 mM KNO₃ + 2 mM NH₄Cl (D). GS activity at time zero were 802 (A), 764 (B), 900 (C) and 917 (D) nmoles γ -glutamyl hydroxamate min⁻¹ mg protein⁻¹ and for Fd-GOGAT were 420 (A), 390 (B), 435 (C) and 403 (D) nmoles glutamate min⁻¹ mg protein⁻¹. Time zero was taken as 100%. Each value is the mean \pm SE of three independent experiments.

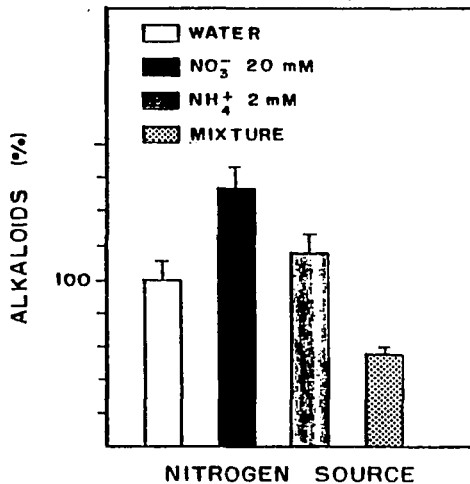


Figure 3. Alkaloid content in the leaves of plants incubated with water (□), 20 mM KNO₃ (■), 2 mM NH₄Cl (▨) and 20 mM KNO₃ + 2 mM NH₄Cl (▩). The alkaloid content the control plants was taken as 100%. Each value is the mean ± SE of three independent experiments.

Sometido en *Physiologia Plantarum*

**Characterization of glutamine synthetase isoenzymes of
Catharanthus roseus plants under water stress**

Ma. Lourdes Miranda-Ham and Víctor M. Loyola-Vargas

**División de Biología Vegetal, Centro de Investigación Científica
de Yucatán, Apdo. Postal 87, Cordemex 97310, Yucatán, México**

Received date

Accepted date

Footnotes

Financial source. National Council for Science and Technology Improvement (México), Grant No. P228CCOX880121.

Abbreviations: GS, glutamine synthetase; MPa, megapascals.

Abstract

Experiments were undertaken with *Catharanthus roseus* plants subjected to water stress by withholding water to try to explain at the molecular level the observed changes in glutamine synthetase activity. Two levels of stress were used: a medium stress (-1.6 MPa) and a higher stress (-3.5 MPa). We found a decline in the activity of glutamine synthetase that coincided with the diminishing water potential. The relative contribution of its two isoenzymes changed throughout the stress treatment. There was no *de novo* synthesis of glutamine synthetase and there was a preferential loss of the chloroplastic isoenzyme. This latter fact is explained in terms of decreases in the glycosylation level of this isoenzyme, rendering it more labile to the action of proteases.

Introduction

Glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2), the enzyme responsible for ammonia assimilation to organic compounds in higher plants, exists as distinct isoforms in different organs, tissues and subcellular locations (8). In the leaves, two isoenzymes have been described: one, in the cytosol and the other, in the chloroplasts. A systematic study of numerous plants (9) has led to their classification into four groups according to their relative leaf GS1 and GS2 activities. The groups III and IV contain mainly, or solely, GS2 activity and comprise the majority of C₃ plants.

Most of the reports dealing with proteins during deleterious environmental conditions describe the appearance or disappearance of spots in two-dimensional gels; it is seldom given a function to any of these changing proteins. On the other hand, there are some reports dealing with the behavior of enzymes during stress, but the information remains at the level of describing changes in their activities. Previous studies (10, 11) have suggested that the enzymes involved in ammonia assimilation during stress might be different at the molecular level from those of a plant that has never been under such conditions. The differences could be attributed to a number of factors: *de novo* synthesis of new isoenzymes, rearrangement of subunits or covalent modification of preexisting enzymes that lead to alterations in their catalytic and regulatory properties.

In *Escherichia coli*, GS is regulated by a mechanism of adenylation-deadenylation depending on the nutrients available in the medium (7). In the case of higher plants, there is no evidence regarding a post-translational modification that could modify GS activity. In fact, there is only one report (12), which demonstrated a covalent modification (glycosylation) of GS from tobacco leaves.

When *C. roseus* plants were subjected to water and salt stress treatments GS activity decreased to about half its initial value. Even if the stress treatment was prolonged, some GS activity still remained (13). This might indicate that this enzyme might be in some way different from that in the control plants. It was therefore decided to study GS at a molecular level, to determine the occurrence of changes (if any) on this enzyme under a deleterious environment.

Material and Methods.

Plant Material. One year old *C. roseus* plants, kept in a greenhouse under natural photoperiod, at 25 °C, were employed as sources of leaves for the isolation of the isoenzymes. The plants were transferred to a semicontrolled growth chamber (25°C, 16/8 h photoperiod), where water stress was imposed by withholding water. Control plants were watered daily. The response of the plants to the water stress was characterized by monitoring water relations and stomatal diffusive resistance. The hydric potential was determined using a dew point hygrometer (Wescor HR33T) with C-52 sample chambers and the stomatal diffusive resistance with a steady state porometer Li-cor 1600. Samples of the leaves were harvested when plants

were under a medium stress (-1.6 MPa) and high stress (-3.5 MPa). The leaf samples were immediately frozen with liquid nitrogen and kept at -70°C until processed.

Isoenzymes isolation. Leaves (2.5 g) were homogenized in a mortar and pestle with 7.5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 1 mM MgCl₂, 10 mM mercaptoethanol, 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 10 mM glutamate, 0.2 mM PMSF and 5% PVP. The homogenate was centrifuged at 18,000 x g for 45 min. The supernatant was desalted and concentrated by ultrafiltration through an Amicon membrane XM300. One ml was then applied to a column (20 cm x 10 mm diameter) of DEAE-Sephadex equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM mercaptoethanol, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂. The proteins were eluted at a flow rate of 10 ml h⁻¹ with 30 ml buffer followed by 50 ml of a linear 0-400 mM KCl gradient in buffer. Fractions (1.5 ml) were collected and GS activity was determined spectrophotometrically (6).

Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting. Proteins were separated in one dimensional 10% polyacrylamide gels (5) and blotted into nitrocellulose (15). GS proteins were located using an antiserum raised to the nodule specific GS isoenzyme of *P. vulgaris* (2) coupling to an alkaline phosphatase conjugated antibody (Sigma).

Periodic acid-Schiff staining. After electrophoresis, the gel was fixed with 12% (w/v) trichloroacetic acid for 30 min. It was then stained as described by Zacharius et al. (16), using an histochemical periodic acid-Schiff kit (Sigma kit No. 395B).

Concanavalin A Blots. The detection of the complexes formed by the interaction of glycoproteins and concanavalin A was performed according to Evans et al. (3), with the following modifications. After electrophoresis, the polypeptides were transferred to a nitrocellulose filter (Millipore, 0.45 m). The filter was blocked with Con A buffer [500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5% (v/v) Tween 20]. It was then transferred to a 1:1000 dilution of peroxidase conjugated-concanavalin A. To visualize the complexes, color was developed by incubating the filter in the developing solution [To 40 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), add 30 mg 4-chloro-1-naphthol previously dissolved in 10 ml methanol and 60 l of 30% H₂O₂]. The reaction was stopped by soaking the filter in distilled water.

Results and Discussion.

In a previous study, the isolation of two isoenzymes from the leaves of *C. roseus* plants was reported (Miranda-Ham and Loyola-Vargas, submitted). They were named GS1 and GS2, according to their elution order from a DEAE-Sephadex column. Their contribution to total GS activity is 15 and 85%, respectively. GS1 is located in the cytosol, while GS2 is inside the chloroplasts. Given the distribution in the different cellular compartments and the contribution of the isoenzymes to the total activity, *C. roseus* belongs to group III, along with other C₃ plants (9).

C. roseus plants were subjected to a gradual stress treatment by withholding water. Two stress levels were used for this study: one of medium strength, -1.6 MPa and a second of higher strength, -3.5 MPa. In the case of the higher stress treatment, the leaves were almost completely wilted but upon rewatering, they recovered their turgidity in 12 h. The hydric potential of fully turgid leaves was -0.9 MPa. The stomatal diffusive resistance increased from 13 (control) to 25 scm^{-1} (-3.5 MPa).

When total activity was determined in the control and both medium and highly stressed leaf samples, a decline could be observed which coincided with the diminishing water potential (Fig. 1). The most severe loss of activity occurred during the first stages of the stress treatment. As the treatment was prolonged, this loss was less pronounced but it was never total, as has been observed by Ríos Chávez et al. (13).

In order to evaluate the contribution of each isoenzyme to the total GS activity, the two forms were separated on a DEAE- Sephadex column. A change in their contribution could be observed as the water stress treatment progressed. In the medium strength stress, there seemed to be no change in their relative contributions (Fig. 2B). Nevertheless at -3.5 MPa, there was a marked increment in GS1 activity, while GS2 declined, reaching an activity ratio of almost 1:1 (Fig. 2C).

This loss of activity could be accounted for a loss in GS as a protein, i.e. that no GS is being synthesized during this period or that it might be selectively inactivated to preserve the cellular energy reserves. Changes in the cellular metabolism have been well documented regarding a significant lowered levels of protein synthesis (1), by disrupting polyribosomes (1) or by enhancing the activity of nucleases, and also the complete shutdown of metabolic pathways of synthesis, leaving turned on only those functions which are aimed to allowing the cell to survive. When proteins from total crude extracts were separated in an SDS-PAGE gel, blotted into nitrocellulose and probed with anti-GS antibodies, there were only very faint residues in lanes 1 and 2, which correspond to the medium and high stressed samples (Figure 3). In lane 3 (control), two bands could be observed: GS2, with a molecular weight of 48,000 and GS1, of 46,000. However, if the isoenzymes were probed separately, GS2 disappeared from the filter, whereas GS1 remained at the same level of the control (data not shown). These data suggest that there is no *de novo* synthesis of GS and that there is actually a loss of GS2.

On studying the characteristics of GS in the leaves of *C. roseus*, it was determined that only GS2 is glycosylated, using two different approaches (Miranda-Ham and Loyola-Vargas, submitted). The first one involved a direct stain after electrophoresis for glycoproteins, using PAS stain (periodic acid - Schiff dye), that renders a red staining to bands containing carbohydrate residues; and the second one, binding of concanavalin A to bands transferred to nitrocellulose. These same methodologies were employed with the GS2 preparations isolated from medium and highly stressed leaf samples.

A clear positive result could be seen for the control sample: a red band, corresponding to the molecular weight of GS2 was found after using the PAS dye and a blue band, that indicates the successful binding of concanavalin A to glycosidic residues of GS2 (lane 2 in Figs. 4A and 4B). However, the level of glycosylation of GS2 changed when plants

are subjected to a water stress: there was a fainter response to PAS stain and a decreased binding of Concanavalin A in the case of the medium stressed leaves (lane 1) and there was no response in those under a higher level of stress (lane 3 in Figs. 4A and 4B).

It has been reported that many plant proteins that are transported from one compartment to another are glycosylated (14) and also that the deglycosylation of some proteins render them more susceptible of being attacked by proteases (4), therefore the lowered GS activity found in the leaves of *C. roseus* during the imposition of water stress could be explained in terms of a loss of GS2 as protein due to the lack of mannosyl and glucosyl residues, that stabilize its structure and permit its transport inside the chloroplast.

This is the first report on the nature of the changes in a fundamental enzyme of nitrogen metabolism when a plant is under deleterious environmental conditions.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the kind gift of *Phaseolus vulgaris* antibodies from Drs. M. Bennett, J.V. Cullimore and M. Lara.

Literature cited

1. Bewley JD (1981) Protein synthesis. In LG Paleg, D Aspinall, eds, *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, Academic Press, Sydney, pp 261-282
2. Cullimore JV, Mifflin BJ (1984) Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant forms of the enzyme from *Phaseolus* root nodules. *J Exp Bot* 35: 581-587
3. Evans EA, Gilmore R, Blobel G (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 581-585
4. Faye L, Johnson KD, Sturm A, Chrispeels MJ (1989) Structure, biosynthesis and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. *Physiol Plant* 75: 309-314
5. Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685
6. Loyola-Vargas VM, Sánchez de Jiménez E (1986) Regulation of glutamine synthetase/glutamate synthase cycle in maize tissues. Effect of the nitrogen source. *J Plant Physiol* 124: 147-154
7. Magasanik B (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann Rev Genet* 16: 135-168
8. McNally S, Hirel B (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol Vég* 21: 761-774
9. McNally S, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR (1983) Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol* 72: 22-25
10. Miranda-Ham ML, Loyola-Vargas VM (1987) *In vitro* effects of PEG and proline on ammonium assimilation enzymes of maize. *J Plant Physiol* 129: 169-174
11. Miranda-Ham ML, Loyola-Vargas VM (1988) Ammonia assimilation in *Canavalia ensiformis* plants under water and salt stress. *Plant Cell Physiol* 29: 747-753
12. Nato F, Hirel BB, Nato A, Gadal P (1984) Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. *FEBS Lett* 175: 443-446

13. Ríos Chavez P, Robert M, Reyes J, Oropeza C, Loyola-Vargas VM (1987) GDH and GS behaviour in *Catharanthus roseus* under stress (abstract No. 295). *Plant Physiol* 83: S-49

14. Sengupta C, DeLuca V, Bailey DS, Verma DPS (1981) Post- translational processing of 7S and 11S components of soybean storage proteins. *Plant Mol Biol* 1: 19-34

15. Towbin H, Staehelin T, Gordon V (1981) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

16. Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ (1969) Glycoproteins staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* 30: 148-152

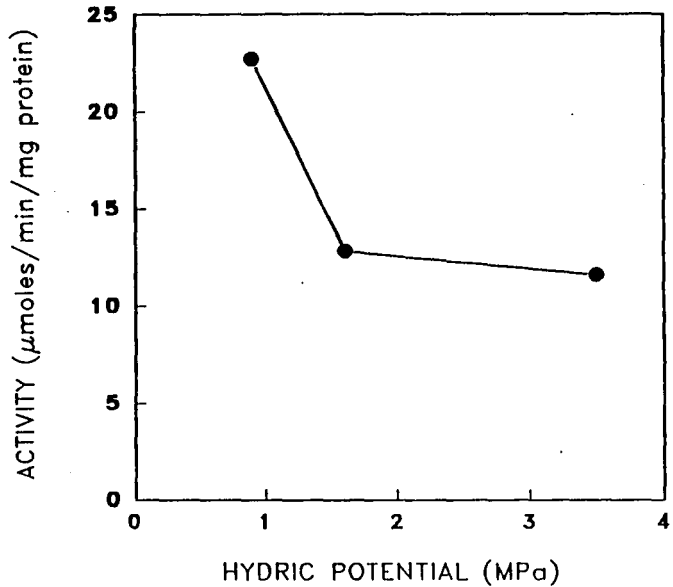


Figure 1. Glutamine synthetase activity (μ moles glutamylhydroxamate/min/g protein) in the leaves of plants under a water stress treatment by withholding water. All values are the average of three independent experiments.

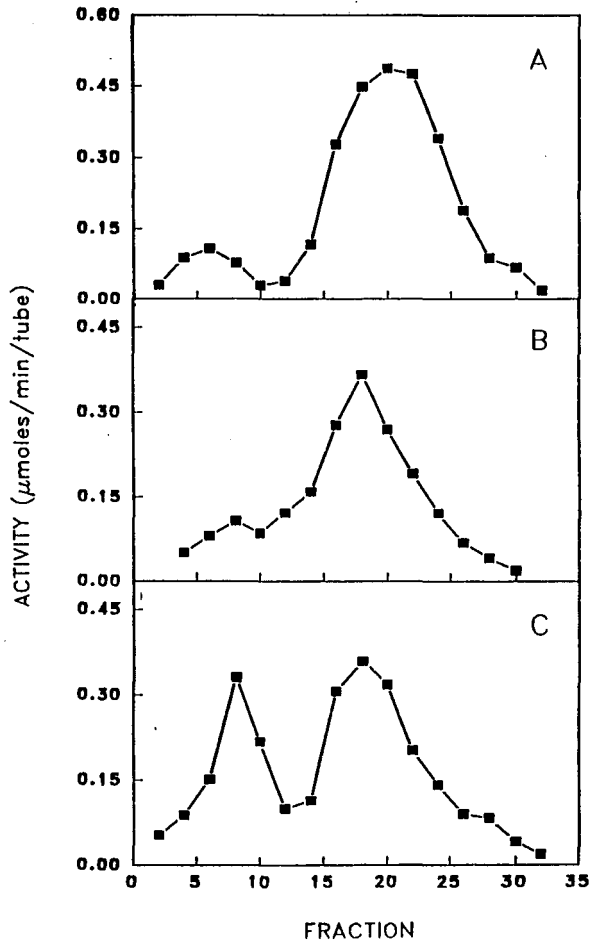


Figure 2. Elution profiles of GS activity from a DEAE-Sephadex column from leaf extracts of plants under different levels of water stress. A, control; B, -1.6 MPa; C, -3.5 MPa..

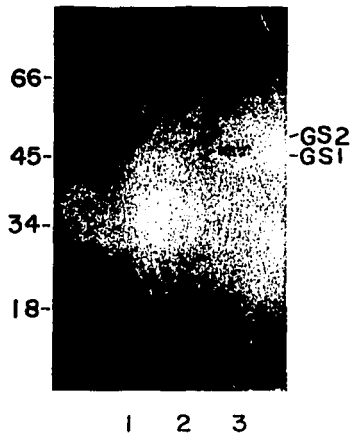


Figure 3. Western blot of the crude extracts from control and water stressed plants, stained with anti-GS antisera. Lane 1, -1.6 MPa; lane 2, -3.5 MPa; lane 3, control.

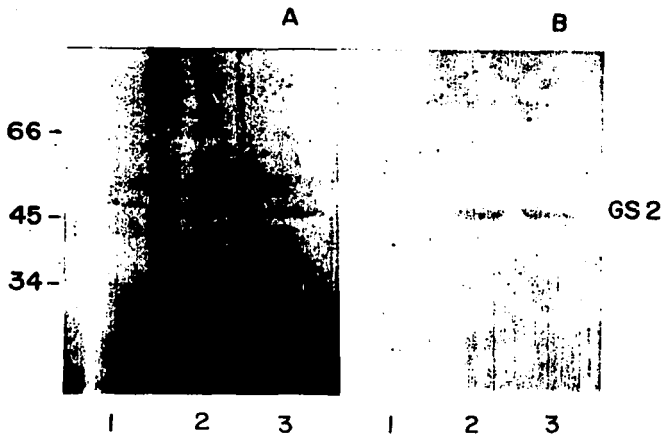


Figure 4. Determination of the presence of carbohydrate residues in the GS2 preparations from control and stressed plants. A. Periodic acid-Schiff staining of the SDS gel; lane 1, -1.6 MPa sample, lane 2, control, lane 3, -3.5 MPa sample. B. The same gel transferred to nitrocellulose and bound to peroxidase conjugated-concanavalin A. lane 1, -1.6 MPa sample, lane 2, control, lane 3, -3.5 MPa sample.