

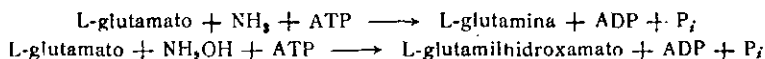
CONDICIONES DE REGULACION DE GLUTAMINA.
SINETASA EN *PROTEUS MIRABILIS*

por

C. VICENTE y C. E. RISUEÑO

INTRODUCCIÓN

La glutamina sintetasa es un enzima que cataliza las siguientes reacciones:

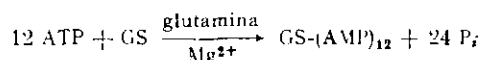


En *Proteus mirabilis*, el enzima parece estar regulado en concordancia con una glutamato deshidrogenasa, NADPH dependiente, enzima que proporciona suficiente cantidad de glutamato libre, el cual podrá ser utilizado, en parte, para la síntesis de glutamina. Mientras que la glutamato deshidrogenasa de este microorganismo muestra ser inducible por glucosa, la glutamina sintetasa parece ser independiente de la fuente de carbono utilizada (VICENTE y RAMÍREZ, 1972).

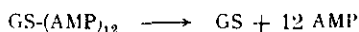
El enzima de *Escherichia coli* es una proteína homogénea disociable por guanidina en 12 o 14 subunidades (WOOLFOLK et al., 1966), de peso molecular $5,3 \cdot 10^4$, lo que supone un peso molecular de, aproximadamente, $6,8 \cdot 10^5$. La urea, a concentraciones de 1 M y en presencia de agentes quelantes de cationes, disocia al enzima en subunidades inactivas que pueden asociarse en presencia de Mn^{2+} . Si la reacción se lleva a cabo a bajas temperaturas, del orden de 4° C, el enzima reasociado recobra su actividad, lo que no se logra si la reasociación se realiza a temperaturas superiores, del orden de 25° C.

Un punto interesante en la regulación de este enzima viene determinado por la modificación *in vivo* de su estructura, por ATP. Se ha

definido un enzima inactivante, la ATP: glutamina sintetasa adenil transferasa, que modifica la glutamina sintetasa según la siguiente reacción (WULF et al., 1967):



siendo el complejo GS-(AMP)₁₂ inactivo. El enzima inactivante es, a su vez, inhibido por α -cetoglutarato y ATP (HOLZER, 1969). El papel del AMP, según HOLZER et al (1969) quedaba reducido a inhibir el enzima activante, que catalizaría la reacción:



aunque, para WEDLER et al. (1978), un isozima de glutamina sintetasa, producido por *Bacillus caldolyticus*, es fuertemente inhibido por AMP.

En el presente trabajo se ha estudiado la síntesis de glutamina sintetasa así como algunos de sus mecanismos de regulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Proteus mirabilis, NCIB 5887, mantenido en medios sólidos recomendados por MAGAÑA y RUIZ (1967) se sembró en medios líquidos recomendados por los mismos autores y suplementados con glucosa y sulfato amónico a concentraciones 50 y 40 mM respectivamente. Las bacterias eran crecidas sobre estos medios a 37° C en una agitación de 120 oscilaciones por minuto. Las células eran recogidas por centrifugación a 16.600 x g, durante 10 minutos, a 4° C, lavándose posteriormente con tampón fosfato 75 mM de pH 7,7. La ruptura de las células se realizaba por sonicación en un oscilador MSE durante 1 minuto con protección de hielo, añadiendo al tampón de extracción 2-mercaptoetanol 0,14 M. Este extracto crudo era centrifugado a 28.000 x g durante 20 minutos a 4° C, utilizándose el sobrenadante como extracto libre de células. La actividad glutamina sintetasa se estimó por el método de ELLIOT (1955). Las proteínas se valoran por el método de LOWRY et al. (1951).

El enzima se purificó por precipitación con sulfato amónico al 80 por 100 de saturación. El precipitado se recogió por centrifugación a 31.900 x g durante una hora, se dializó frente a tampón fosfato 20 mM,

pH 7,3 y se adsorbió sobre gel de fosfato cálcico, equilibrado con el mismo tampón, en una proporción de 75 mg de gel seco por mg de proteína. Las diferentes fracciones fueron eluidas del gel en un gradiente de molaridades de tampón que osciló entre 20 y 200 mM. El paso de la fracción a través de una columna de Sephadex G-200 no aumentó el grado de purificación.

RESULTADOS

La síntesis de glutamina sintetasa se estimó en cultivos de diez horas sobre glucosa y sulfato amónico en las condiciones descritas. Como

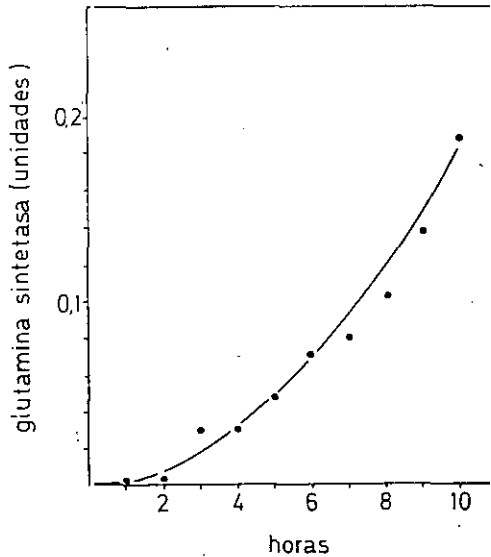


Figura 1.—Evolución de la actividad glutamina sintetasa en cultivos de *Proteus mirabilis* en función del tiempo de cultivo.

muestra en la figura 1, la actividad glutamina sintetasa aumenta progresivamente conforme avanza el tiempo de incubación, alcanzándose al cabo de diez horas una actividad aproximadamente 170 veces superior a la inicial.

Para comprobar la estabilidad del enzima, los extractos libres de

células fueron almacenados a 4° C durante diez días, manteniendo durante el mismo tiempo volúmenes de 2 ml de los mismos extractos a los que se adicionaban 0,2 ml, bien de ATP, bien de AMP 5 mM. Diariamente fue estimada la actividad enzimática para los tres lotes, mostrándose los resultados obtenidos en la figura 2. Mientras que la actividad del extracto se mantiene prácticamente inalterada durante los diez días de almacenamiento, la incubación con ATP incrementa en cuatro veces tal actividad, mientras que el AMP prácticamente la anula.

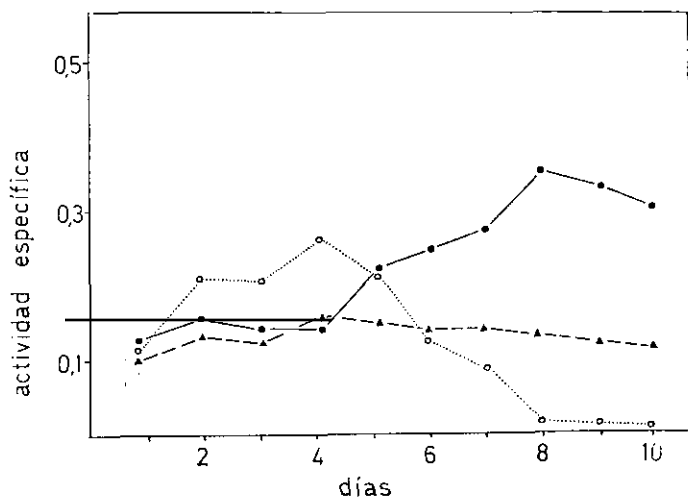


Figura 2.—Efecto de almacenamiento sobre la actividad glutamina sintetasa en extractos libres de células. (▲) sin ningún tratamiento; (●) incubado con ATP; (○) incubado con AMP.

Sospechando que estos efectos no eran directos de los nucleótidos sobre la enzima, sino indirectos a través de enzimas activantes o inactivantes, tal y como se ha descrito en la Introducción, se procedió a purificar el enzima a partir de un cultivo bacteriano de diez horas de incubación. Al extracto libre de células se le adicionó sulfato amónico hasta un 80 por 100 de saturación, concentración a la cual toda actividad enzimática queda retenida en el precipitado. Este fue redissuelto en tampón fosfato 20 mM de pH 7,3 y dializado durante veinte horas a 4° C frente al mismo tampón. Al dializarlo se le adicionó gel de fosfato-cálcico, equilibrado con idéntico tampón, en proporción de 75 mg de gel seco por mg de proteína, eluyendo las distintas fracciones por la-

vado del lecho con tampones del mismo pH cuya molaridad oscilaba entre 20 y 200 mM. La máxima actividad específica fue eluida en el primer lavado. El paso de esta fracción a través de una columna de Sephadex G-200 no mejoró la purificación obtenida, por lo que esta queda resumida en los puntos especificados en la tabla 1.

El enzima purificado 28 veces fue entonces incubado con ATP y AMP y en las condiciones descritas y almacenado a 4° C durante 10 días, midiendo diariamente la actividad. Los resultados se especifican en la figura 3, donde se muestra que el ATP no modifica la actividad específica del enzima purificado mientras que el AMP la rebaja drásticamente.

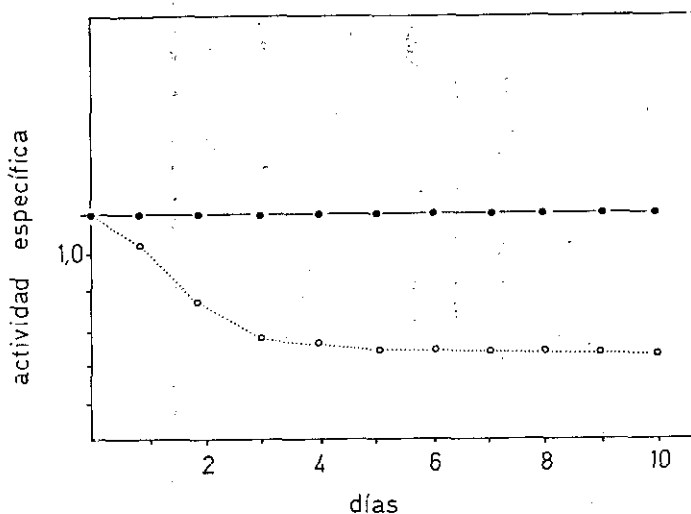


Figura 3.—Efectos del ATP y AMP sobre un glutamina sintetasa parcialmente purificada y almacenada. (●) incubada con ATP; (○) incubada con AMP.

DISCUSIÓN

En las condiciones de cultivo descritas, la síntesis de la glutamina sintetasa por células de *Proteus mirabilis* es óptima. El enzima ha sido purificado 28 veces sobre el extracto libre de células y tanto el enzima crudo como el purificado se muestran bastante estables en almacenamiento. Cuando los extractos libres de células son incubados con ATP durante varios días, el enzima muestra una activación que es máxima al octavo día. Este efecto no se puede adjudicar a la inhi-

T A B L A 1

Purificación de glutamina sintetasa de P. mirabilis

	Volumen ml	Proteína mg/ml	Actividad específica	Actividad total	Purificación	Recuperación %
Extracto libre de células	40	0,40	0 00375	0,060	-	100
Precipitado SO ₄ (NH ₄) ₂ 80 % saturación.....	5	0,55	0,0181	0,050	4,85	83
Eluato gel primera fracción.....	5	0,04	0,105	0, 215	28	35,9

bición de una ATP:glutamina sintetasa adenil transferasa ya que, en ausencia de ATP, la actividad sintetásica de extracto libre de células permanece inalterada. Podría ser entonces debido al efecto activador sobre el enzima activante que disociaría el complejo GS-(AMP)₁₂ que pudiera haberse formado *in vivo* durante el crecimiento celular. Por el contrario, la presencia de AMP en la preparación enzimática anula la actividad glutamina sintetasa al cabo de ocho días de incubación.

El efecto de ambos nucleótidos sobre el enzima purificado aboga por esta hipótesis. El ATP no modifica la actividad enzimática dentro del período de experimentación, estando en relación con la desaparición del enzima activante de la preparación, perdido presumiblemente durante el período de purificación. Sin embargo, el efecto del AMP se mantiene, lo que indicaría que el AMP podría actuar, no solo por vía indirecta como inhibidor del enzima activante, sino directamente como inhibidor de la glutamina sintetasa.

R E S U M E N

Se ha purificado 28 veces una glutamina sintetasa de *Proteus mirabilis*. Se postula que el ATP actúa sobre la glutamina sintetasa indirectamente, como activador del enzima que disocia el complejo inactivo GS-(AMP)₁₂. El AMP, por el contrario, se comporta como inhibidor de la glutamina sintetasa al margen de su acción sobre el enzima activante.

R E F E R E N C I A S

- W. H. Elliot — 1955 — En «Methods in Enzymology — (Colowick, S. P., Kaplan, N. O. eds.) — 2, 337. Academic Press. New York.
- Helzer, H. — 1969 — Adv. Enzymol., 32, 297.
- Holzer, H., Mecke, D., Liess, K., Wulff, K., Heilmeyer, L., Ebner, E., Gancedo, C., Schutt, H., Battig, F. A., Heinrich, P., Wolf, D. — 1969 — FEBS Symposium, 19, 171.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., R. J. — (1951) — J. Biol. Chem. 193, 265.
- Magaña, I., Ruiz, J. — 1967 — J. Bacteriol. 93, 1.294.
- Wedler, F. C., Kenney, R. M., Ashour, A. E., Carfi, J. — 1978 — Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 122.
- Vicente, C., Ramírez, R. — 1972 — Rev. Esp. Fisiol., 28, 293.
- Woolfolk, C. A., Shapiro, R., Stadtman, E. R. — 1966 — Arch. Biochem. Biophys., 116, 177.
- Wulff, K., Zecke, D., Holzer, H. — 1967 — Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 340.