



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

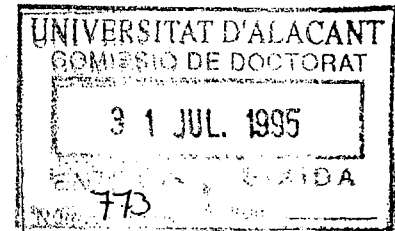
Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun deis capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.

UNIVERSIDAD DE ALICANTE

FACULTAD DE CIENCIAS



**"Glutamato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente
del Archaea *Haloferax mediterranei*.
Estudios cinéticos y características moleculares."**

JUAN FERRER CASANOVA
1995



UNIVERSIDAD DE ALICANTE
DEPARTAMENT D'AGROQUÍMICA I BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA Y BIOQUÍMICA

Ap. Correus 99

--

E - 03080 ALACANT

--

Telf. 96 / 5903527

--

Telefax 96 / 59

D. JORGE MATAIX BENEYTO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
AGROQUIMICA Y BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
UNIVERSIDAD DE ALICANTE.

CERTIFICO: Que la memoria adjunta, titulada " Glutamato deshidrogenasa NADP⁺ del Archaea *Haloferax mediterranei*. Estudios cinéticos y características moleculares.", presentada por D. Juan Ferrer Casanova, para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en este Departamento bajo la dirección de la Dra. M. José Bonete Pérez.

El presente ejemplar ha sido revisado por el profesor que certifica.

Alicante, Julio de 1995.



UNIVERSIDAD DE ALICANTE

DEPARTAMENT D'AGROQUÍMICA I BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA Y BIOQUÍMICA

Ap. Correus 99

--

E-03080 ALACANT

--

Tel. 96 / 5903400 Ext. 3111

--

Fax 96 / 590

Trabajo presentado para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección
Biológicas.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Fdo. Juan Ferrer Casanova.

DIRECTORA

Fdo. **M.ª. José Bonete Pérez.**
Profesora Titular de Bioquímica y
Biología Molecular de la Facultad
de Ciencias de la Universidad de
Alicante



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente en la confección del presente trabajo, muy especialmente a la Dra. D^a. María José Bonete Pérez, por su dirección y ayuda constante a lo largo de todo el trabajo, sin ella este trabajo no se habría llevado a cabo.

Igualmente quiero agradecer al Dr. D. Eduardo Cadenas Bergua y al Dr. D. Francisco Llorca Alcaraz el haberme dado la oportunidad de trabajar en la División de Bioquímica. A D. Francisco Pérez Pomares y a la Dra. D^a Mónica Camacho Carrasco por su inestimable ayuda en la realización de dicho trabajo.

Asímismo doy las gracias al Dr. M.J. Danson y al Dr. D. Hough de la Universidad de Bath, por la secuencia N-terminal. Al Dr. D. Francisco Rodríguez Valera director del Departamento de Microbiología de esta Universidad por suministrarnos el material biológico utilizado.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mi Esposa, Hija y Padres.



El presente trabajo ha sido subencionado en parte por
los proyectos:

- BI093-0660-CO4-03 CICYT
- GV-1170793 Generalitat Valenciana.



INDICE

1. OBJETIVO E INTERES DEL TRABAJO	6
2. INTRODUCCIÓN.	8
2.1. ARQUEOBACTERIAS.	8
2.1.1. Características generales.	8
2.1.2. Taxonomía	11
2.2 ARCHAEAS HALOFILICAS (Familia Halobacteriaceae). .	14
2.2.1. Características generales	14
2.2.1.1. Hábitat y condiciones de crecimiento. .	14
2.2.1.2. Taxonomía.	15
a. <i>Halobacterium</i>	15
b. <i>Haloferax</i>	16
2.2.1.3. Metabolismo	19
2.2.1.4. Solutos compatibles y equilibrio iónico .	20
2.2.1.5. Lípidos de membrana	20
2.2.1.6. Envolturas celulares	22
2.2.1.7. Genética de las halobacterias	23
2.2.2. Proteínas halofílicas	24
2.2.2.1. Efectos de las sales en la estructura . .	24
2.2.2.2. Efecto de las sales en la actividad de los enzimas halofílicos.	27
2.3 GLUTAMATO DESHIDROGENASA.(EC 1.4.1.2-4)	29
2.3.1 Propiedades catalíticas	29
2.3.1.1 Actividad catalítica. Deshidrogenasas piridín dependientes	29
2.3.1.2 Actividad catalítica glutamato deshidrogenasa (GDH)	32

2.3.1.3	Especificidad de coenzima y distribución de glutamato deshidrogenasa.	33
2.3.1.4	Unión coenzimas glutamato deshidrogenasa	35
2.3.2	Propiedades moleculares	37
2.3.2.1	Estructura	37
2.3.2.2	Composición de aminoácidos	39
2.3.2.3	Secuencia de aminoácidos	39
2.3.2.4	Centro activo	41
2.3.3	Regulación de la síntesis	42
2.3.4	Evolución de glutamato deshidrogenasa	43
2.3.5	Aplicaciones	45
3.	MATERIALES Y METODOS	49
3.1	MATERIALES	50
3.2	MÉTODOS.	52
3.2.1	Medio de cultivo.	52
3.2.2	Mantenimiento de la cepa	53
3.2.3	Precultivo y Cultivo	53
3.2.4	Extracto bacteriano	53
3.2.5	Obtención del extracto crudo	54
3.2.6	Determinación cuantitativa de proteína.	54
3.2.7	Determinación de actividad enzimática	56
3.2.8	Purificación de glutamato deshidrogenasa.	56
3.2.8.1	Cromatografías	56
3.2.8.2	Electroforesis	57
	Condiciones de electroforesis	59
3.2.9	Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	61
	Reactivos.	61
	Preparación del agente derivatizante	62
3.2.10	Western blotting	62

4. RESULTADOS	65
4.1 EFECTO DE LAS FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN <i>Hf.mediterranei</i>	65
4.1.1 Introducción	65
4.1.2 Metodología (Fuente de Nitrógeno)	66
4.1.3 Resultados y discusión	66
4.1.4 Metodología (Fuente de Carbono).	71
4.1.5 Resultados	71
4.2 PURIFICACIÓN DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA	74
4.2.1 Introducción	74
4.2.2 Metodología	74
4.2.3 Resultados y Discusión	80
4.2.4 Criterio de pureza	83
4.3 COMPORTAMIENTO HALOFILICO Y TERMOFILICO	84
4.3.1 Efecto de las sales en la estabilidad	84
4.3.1.1 Introducción	84
4.3.1.2 Resultados	87
4.3.2 Efecto de las sales en la actividad	91
4.3.2.1 Introducción	91
4.3.2.2 Resultados	92
4.3.3 Estudios de temperatura	104
4.3.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	104
4.3.3.2 Cinética de la Inactivación térmica del enzima	108
4.4 MECANISMO CINÉTICO	113
4.4.1 Introducción	113
4.4.1.1 Estudio de velocidad inicial en sistemas terreactantes	113
4.4.1.2 Estudios de inhibición por producto	113

4.4.1.3 Inhibición por análogos de sustratos, inhibición competitiva	117
4.4.1.4 Ejemplos de enzimas con distintos tipos de mecanismos	121
MECANISMOS TOTALMENTE AL AZAR	121
MECANISMOS PARCIALMENTE AL AZAR	122
MECANISMOS PING-PONG	122
MECANISMOS ORDENADOS	123
4.4.2 Mecanismo cinético de glutamato deshidrogenasa	124
4.4.2.1 Introducción	124
4.4.2.2 Metodología	128
4.4.2.3 Resultados	133
Estudios de inhibición por producto.	142
Estudios de Inhibición por análogos de sustratos	145
4.5 ESTUDIOS DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS IONES HIDROGENO (pH) EN EL ENZIMA	152
4.5.1 Introducción	152
4.5.2 Metodología	153
4.5.3 Resultados y discusión	158
4.6 PROPIEDADES MOLECULARES	163
4.6.1 Peso Molecular	163
4.6.1.1 Introducción	163
4.6.1.2 Metodología	166
Determinación del tamaño de la subunidad	168
4.6.1.3 Resultados y discusión	168
4.6.2 Composición de aminoácidos	173
4.6.2.1 Introducción	173

4.6.2.2 Metodología	174
4.6.2.3 Determinación de Triptófano	177
4.6.2.3.1 Introducción	177
4.6.2.3.2 Metodología	179
4.6.2.3.3 Resultados	180
4.6.2.4 Resultados y Discusión	182
4.6.3 Secuencia aminoacídica N-terminal	187
4.6.3.1 Introducción	187
4.6.3.2 Metodología	188
4.6.3.3 Resultados y discusión	188
5. CONCLUSIONES.	192
6. BIBLIOGRAFIA	196
APENDICE I	222
APENDICE II	224



1. OBJETIVO E INTERES DEL TRABAJO

En la elección de *Hf.mediterranei*, como organismo para aislar la glutamato deshidrogenasa (NADP-dependiente), se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) Sus bajos requerimientos nutricionales permiten su desarrollo tanto en medio mínimo como en medios complejos.
- 2) Los requerimientos salinos mínimos de esta bacteria son menores que otras halobacterias (Archaeas).
- 3) Para dichas bacterias, ya están disponibles herramientas utilizables a nivel de genética molecular.
- 4) Es un buen modelo para estudios de organización genómica debido que este género muestra una mayor estabilidad en la organización del DNA que el género *Halobacterium*, constituyendo un modelo en estudios de Biología Molecular en general.

Se aisló, purificó y caracterizó la NADP-GDH en *Haloferax mediterranei*, aprovechando sus bajos requerimientos salinos para determinar el mecanismo cinético en ausencia de sal condiciones no permitidas en *H.halobium*. Este trabajo se ha finalizado con la secuencia del N-terminal de la proteína para su posterior continuidad en estudios de aislamiento, clonaje, secuenciación y expresión del gen; que nos permitirán realizar el diseño molecular de la estructura tridimensional de la proteína, para analizar sus aspectos estructurales más sobresalientes.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. INTRODUCCIÓN.

2. INTRODUCCIÓN.

El microorganismo utilizado en este estudio como material biológico, *Haloferax mediterranei*, forma parte de un grupo taxonómico muy especial: las arqueobacterias (Archaea). Por ello la primera parte de esta introducción está dedicada a la descripción de este grupo en general, y de las halobacterias en particular.

2.1. ARQUEOBACTERIAS.

2.1.1. Características generales.

Las arqueobacterias no se reconocieron como unidad taxonómica hasta el año 1977, a pesar de que muchas de sus especies individuales se conocían con anterioridad. En ese año, Woese y Fox basándose en la comparación de los catálogos de fragmentos de rRNA 16 S (ó 18 S) obtenidos por digestión con ribonucleasa, propusieron la clasificación de los seres vivos en tres reinos: eubacterias (o bacterias verdaderas), arqueobacterias y eucariotas (Woese y Fox, 1977). Más recientemente, basándose en el análisis de la secuencia del RNA ribosómico 23 S (rRNA 23S) Leffers et al. (1986) también sugirieron la existencia de tres líneas de evolución de organismos: Eucariotas, Eubacterias y Archaeobacterias.

Las arqueobacterias muestran características no encontradas en otros organismos vivos; se ha especulado que estos organismos son los que mejor reflejan los posibles seres vivos de antaño, ya que viven en condiciones ambientales extremas similares a las que prevalecieron durante el comienzo de la vida en la Tierra, como son: temperaturas elevadas (que oscilan desde 55°C a 110°C), concentraciones salinas de hasta 5 M NaCl, pHs que varían entre 1 y 11, bajas concentraciones de oxígeno, etc..

Además de la importancia evolutiva, las arqueobacterias poseen un considerable potencial biotecnológico debido a que las macromoléculas que las constituyen, entre ellas sus enzimas, poseen gran resistencia a ambientes extremos y por consiguiente una gran estabilidad, que es una de las propiedades más apreciadas en un contexto industrial (Hough y Danson, 1989).

Las arqueobacterias constituyen un grupo diverso de organismos que incluye: sulfuro-dependientes, termófilos extremos, halófilos extremos y metanógenos. Este grupo muestra muchas diferencias, tanto fenotípica como genotípicamente, con respecto a eubacterias y eucariotas lo que llevó a considerarlo como un reino aparte (revisión por Zillig et al., 1985; Woese & Olsen, 1986). La clasificación filogenética y las relaciones entre arqueobacterias y organismos de otros reinos se realizó basándose en estudios de homología de secuencias de los genes que codifican los rRNA 5 S y 16 S. Estos RNAs fueron seleccionados por las siguientes razones:

- Existen en todos los organismos.
- Las secuencias han variado muy poco durante la evolución.
- El papel funcional que desempeñan en la biosíntesis de proteínas ha permanecido invariable (Woese & Olsen 1986).

En 1987 Leffers et al. publicaron un estudio orientado a clasificar filogenéticamente las arqueobacterias en base a la comparación de las secuencias de genes que codifican al rRNA 23 S., los cuales presentan más variaciones que los dos anteriormente citados. Las implicaciones filogenéticas encontradas les llevaron a reconstruir el árbol filogenético dado por Woese & Olsen (1986), hallando en el reino de las arqueobacterias tres ramas principales: termófilos extremos, halófilos extremos y metanógenos. Los halófilos extremos muestran los relojes (o ratios mutacionales) evolutivos más rápidos (es decir, los genes con más variaciones.) Figura 1 (Leffers et al. 1987).

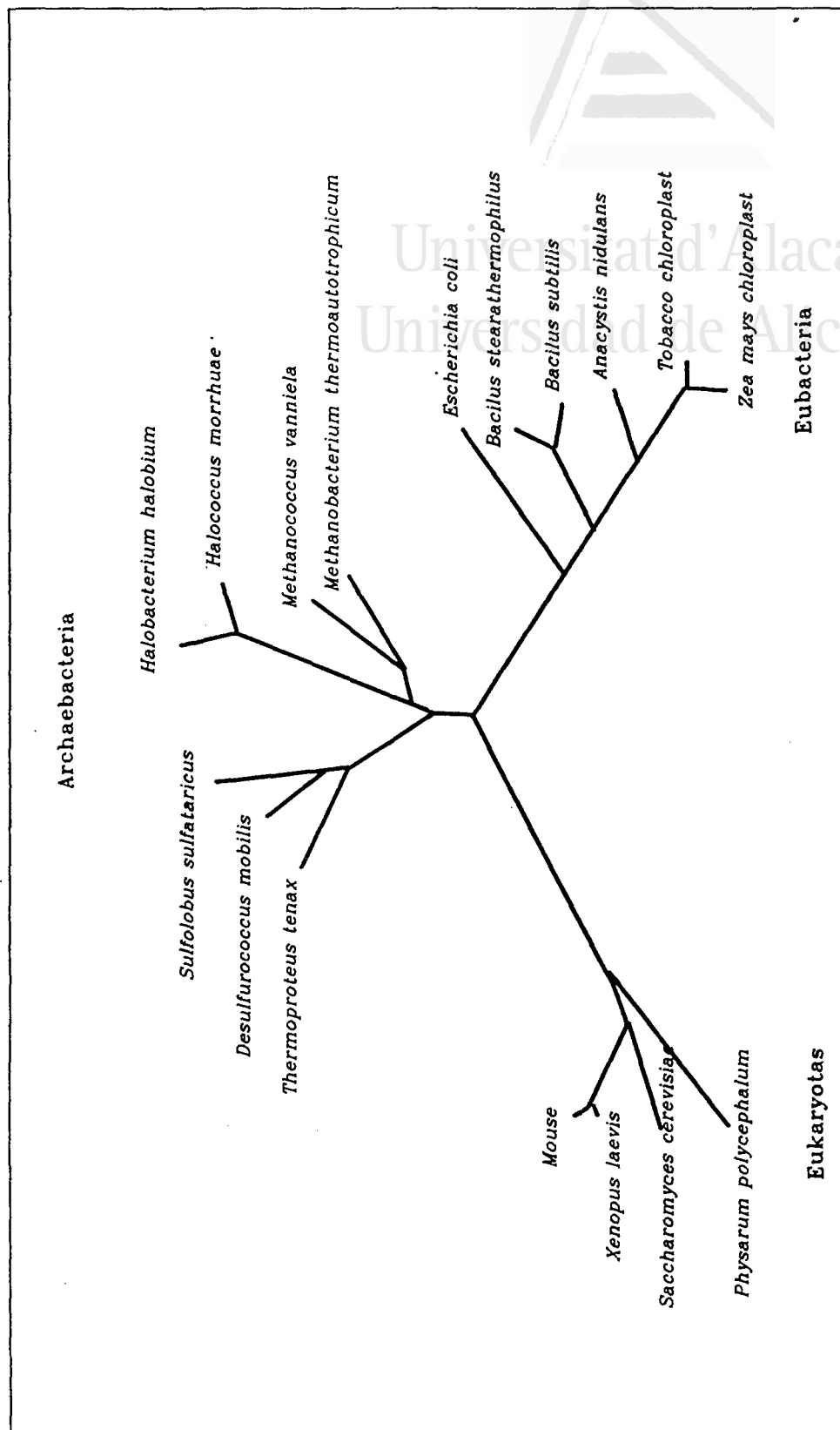


Figura 1.- Árbol filogenético sin raíz de los tres reinos, construido en base a las secuencias de DNA de rRNA 23 S (Leffers et al. 1987).

2.1.2. Taxonomía.

Se ha propuesto una reestructuración de la taxonomía atendiendo a criterios moleculares. Se observó, mediante estudios de rRNA y otras características moleculares, que las diferencias que existen entre Eubacteria, Arqueobacterias y Eucariota son más profundas que las que se utilizan tradicionalmente para distinguir Reinos, como puede ser Reino animal y vegetal. Por ejemplo, todas las eubacterias presentan casi el mismo patrón con respecto al número y tamaño de su RNA polimerasa, sin embargo, la relación existente con éste y el patrón mostrado por arqueobacterias y eucariotas es mínima. Por otro lado los eucariotas son los únicos que poseen las tres funciones de RNA polimerasas separadas.

Basándose en criterios como el anteriormente citado, y teniendo en cuenta que la agrupación en Reinos es insuficiente, se ha propuesto la existencia de un nuevo nivel taxonómico de más alto rango que Reino. El nombre elegido es el de " **Dominio** ", distinguiéndose tres dominios, **Bacteria** (que designaría a las eubacterias), **Archaea** (arqueobacterias) y **Eucarya** (eucariotas). Adicionalmente el término eucariotas puede continuar aceptándose como sinónimo de Eucarya, sin embargo, se recomienda el abandono del termino "Archaeobacteria", ya que sugiere una relación específica entre **Archaea** y **Bacteria** (Woese et al., 1990).

Filogenéticamente en el dominio **Archaea** se distinguen dos grupos principales. Uno, los metanógenos y relacionados que es fenotípicamente heterogéneo, comprendiendo halófilos extremos, especies reductoras de sulfatos (el género *Archaeoglobus*) y dos tipos de termófilos (el género *Termoplasma* y el grupo *Thermococcus*-*Pyrococcus*), además de los tres linajes metanogénicos. El nombre propuesto para todos ellos es *Euryarchaeota*. Para denominar a este reino puede usarse comúnmente el nombre de Euryarchaeotas o Euryotas (Woese et al. 1990). El otro grupo

de **Archaea** comprende organismos más variados, como son termoacidófilos, arqueobacterias sulfuro-dependientes, eocytas o termófilos extremos. Todos ellos guardan una relativa homogeneidad desde el punto de vista fisiológico. Para este reino se sugirió el nombre de Crenarchaeota, comúnmente puede ser aceptable el nombre de Crenarchaeotas o Crenotas (Woese et al. 1990).

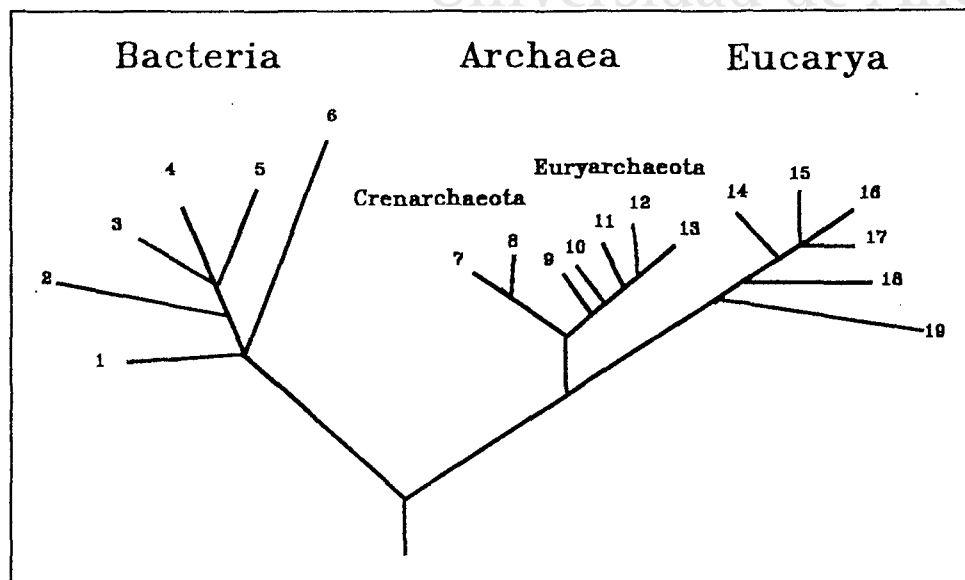


Figura 2.: En esta ilustración se muestra un árbol filogenético donde se observan los tres dominios. El orden y la longitud de las ramas está basado en la comparación de las secuencias de los genes que codifican los rRNA 23S. La posición de la raíz ha sido determinada por comparación de las secuencias de pares de genes que divergen desde cualquier otro anterior, los tres linajes principales emergen desde un ancestro común. El número que etiqueta las ramas se corresponde con los siguientes grupos de organismos. BACTERIA.- 1. Thermotogales, 2. Flavobacterias y relacionados; 3. Cyanobacterias; 4. Bacterias purpúreas; 5. Gram-positivas; y 6. Bacterias verdes no sulfurosas. ARCHAEA.- se distinguen dos reinos: el reino Crenarchaeota: 7. genero *Pyrodictium*; y 8. genero *Thermoproteus*; y el reino Euryarchaeota: 9. Thermococcales; 10. Metanococcales; 11. Metanobacteriales; 12. Metanomicrobiales y 13. Halófilos extremos. EUCARYA.- 14. animales; 15. ciliados; 16. plantas verdes; 17. hongos; 18. flagelados; y 19. microsporidios. (Woese et al. 1990).

Actualmente existe una gran polémica acerca de si Archaea es un Dominio independiente. Hay argumentos basados en comparaciones de secuencias de RNA de 5S que sugieren que el Dominio Archaea es muy similar a Eucarya, derivando en el árbol filogenético de la rama de Eucarya (Figura 2). Otros, basándose en la proteína del choque térmico HSP70, presente en bacterias Gram-negativas y eucariotas, y ausente en Gram-positivas y Halófilos (Archaeas), postulan que Archaea se derivaría de bacterias Gram-positivas. La discusión abarca también a los métodos de comparación de secuencias y los de construcción de árboles filogenéticos con argumentos a favor y en contra, siendo los problemas más usuales los índices de cambios y la raíz del árbol. Los estudios de comparación de secuencias de proteínas no aclaran el problema, por ejemplo, en un análisis de las secuencias de glutamato deshidrogenasas según el método empleado en la construcción del árbol filogenético, las Archaeas estarían más próximas a Bacteria y por otros métodos a Eucarya (Benachenhou-Lahfa et al., 1993). Sin embargo, en el caso de la glutamina sintetasa la secuencia Archaea es más similar a su contrapartida bacteriana que a la eucariota. Brown y Doolittle (1995) quienes junto con otros grupos introducen la idea de usar genes duplicados para establecer la raíz de estos árboles, muestran que Archaea (incluido hipertermófilos) es un grupo monofilogenético (independiente) (Doolittle, 1995).

2.2 ARCHAEAS HALOFILICAS (Familia Halobacteriaceae).

Las halobacterias, halococos y bacterias relacionadas fueron estudiadas sistemáticamente por primera vez, a causa de la contaminación observada en los alimentos salados. En los largos viajes por mar el pescado salado se volvía rojo y se desintegraba. En un principio se les llamó halófilos rojos (Ingram, 1957; Kushner, 1968,1978.;Larsen, 1962,1967).

2.2.1. Características generales.

2.2.1.1. Hábitat y condiciones de crecimiento.

Los halófilos rojos más estudiados son los procedentes de lagos salados, especialmente el Mar Muerto, y los que proceden de salinas como por ejemplo las salinas de Santa Pola (Alicante); también se han aislado directamente de alimentos salados contaminados por halobacterias. Estas bacterias se encuentran distribuidas por todo el mundo. Aparecen rápidamente en salinas, tomando el agua un color rojo-púrpura. La composición iónica del agua puede ser variable de un hábitat a otro, por ejemplo: El Gran Lago Salado (USA) contiene Na^+ como principal catión, mientras que en el Mar Muerto el catión mayoritario es el Mg^{+2} . En otros lagos salados de Africa aparecen altas concentraciones de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{=}$ y no se detecta Mg^{+2} . Muchos de los hábitats naturales hipersalinos se caracterizan por ser eutróficos (ricos en nutrientes), presentar concentraciones relativamente bajas de O_2 disuelto y estar sometidos a una intensa radiación solar (Rodríguez-Valera, 1988). Las células necesitan para el crecimiento concentraciones de 1.5 M de NaCl como mínimo, generalmente de 3-4 M, pero pueden crecer en condiciones saturantes de NaCl (5.5 M) (Kushner, 1978; Larsen, 1984). La temperatura óptima de crecimiento va desde 40°C a 50°C. Gran cantidad de ellas requieren aminoácidos para el crecimiento y son estimuladas por vitaminas, pero

otras pueden crecer en medios mínimos, con un azúcar como única fuente de carbono y energía (Rodríguez-Valera et al. 1980a). La mayoría son estrictamente aerobias; algunas pueden crecer en anaerobiosis, con o sin nitrato.

Haloferax mediterranei puede crecer sobre un amplio rango de concentraciones salinas, el óptimo de sal y la concentración más baja requerida para crecer son menores que los valores correspondientes para las otras *Halobacteriaceae*, excepto para *Hf.volcanii*. Son estrictamente aerobios en oscuridad y con extracto de levadura como sustrato, extremadamente halofílicos con un crecimiento óptimo al 20 % de sales totales. Temperatura óptima de crecimiento a 35°C, no creciendo por encima de 45°C. Fuertemente amilolítico, lipolítico y proteolítico. No produce H₂S a partir de tiosulfato. Indol positivo. Reduce nitratos y nitritos a N₂ (Rodríguez-Valera et al., 1983).

2.2.1.2. Taxonomía.

a. *Halobacterium*.

La familia Halobacteriaceae consiste en bacterias gram-negativas, en forma de varilla o disco (género *Halobacterium*) o cocos (género *Halococcus*). Se reproducen por bipartición, por constricción (*Halobacterium*) o septación (*Halococcus*), y no poseen esporas. En el primero se incluyen las especies *H.volcanii* y *H.vallis*. Las células pueden presentar motilidad o no, la motilidad es observada sólo con algunas especies de *Halobacterium*. Forman colonias rojas, rosas, bermellón, rojo-naranja o rojo-malva y ocasionalmente sin color; las colonias son opacas o translúcidas. El genoma está usualmente compuesto por dos componentes uno mayor y otro menor, este último está integrado por distintos fragmentos de DNA extracromosómico. El tanto por ciento del par G+C en el componente mayor es de 66-68 (moles%) y en el componente menor de 57-60.

Otra característica de las Halobacteriaceae es el contenido en lípidos; todos poseen difitanil éter unido a fosfolípidos como principal componente. La presencia de estos lípidos puede ser fácilmente determinada por la resistencia a los tratamientos de saponificación (Kates et al., 1966).

En la octava edición del Manual de Bergey, *Halobacterium halobium* y *Halobacterium salinarium* aparecieron como especies separadas, pero en la novena edición se consideraron como una sola especie junto con *H. cutirubrum*, bajo el nombre de *H. salinarium* (Larsen, 1984). La reclasificación se debió a las similitudes fisiológicas entre los diferentes aislamientos (organismos clasificados como especies distintas) y a la observación de Fox et al. (1980) en cuanto a la similitud de los catálogos de rRNA 16 S.

b. *Haloferax mediterranei*.

Rodríguez-Valera et al. (1980) aislaron más de 300 halófilos extremos en forma de varilla de las salinas de Santa Pola (Alicante), los enriquecieron haciéndolos crecer en un medio con alta concentración salina y utilizando carbohidratos como principal fuente de carbono y energía. Algunas de las halobacterias aisladas presentaron una característica común: el contenido en pigmentos variaba inversamente con la concentración de sal, es decir, a bajas concentraciones de sal (concentraciones que permitan el crecimiento) se observaba una alta pigmentación, y a altas concentraciones se reducía la producción de pigmentos (Kushwaha et al., 1982). Una de estas bacterias, el linaje R4, fue caracterizada denominándola *Halobacterium mediterranei* (Rodríguez Valera et al., 1983b). Esta bacteria presenta distintas características que la distinguen claramente de las otras halobacterias. *Halobacterium mediterranei* (R-4) desde el punto de vista morfológico es semejante a *H. volcanii* (Mullahkanbhai y Larsen, 1975), es altamente vacuolada

(*H. volcanii*, no presenta vacuolas) y se describió inicialmente desprovista de motilidad (Rodríguez-Valera et al., 1980) y de hecho, así es habitualmente aunque se ha encontrado cierta motilidad en células que crecen en medio líquido durante la fase exponencial. Presentan un mayor espesor en la pared celular 25-35 nm en oposición a los 13 nm que poseen las otras halobacterias. El espesor de la pared podría ser el responsable de la gran resistencia que muestra R-4 frente a otras especies de *Halobacterium* a la ruptura con medios mecánicos (ultrasonificación).

Una característica típica de las especies de *Halobacterium* es la lisis de las células cuando se resuspenden en disoluciones a bajas concentraciones salinas. Para no sufrir lisis *H. halobium* y *H. salinarium* necesitan un 5 % de sal de la misma composición que se encuentra en el agua del mar sin embargo, *Hf. mediterranei* no se rompe al exponerla a una concentración de hasta un 3%, e incluso después de exponerlas al 1% permanecen viables el 10 % de las células.

Actualmente a las especies *Halobacterium mediterranei* y *Halobacterium volcanii* se les engloba en un nuevo género: el género *Haloferax* denominándose como *Haloferax mediterranei* y *Haloferax volcanii*. El cambio de género fue a propuesta de Torreblanca et al. (1986), quienes mostraron claramente que estas halobacterias presentan un remarcado grado de variación fenotípica y genotípicamente hablando, habiéndose demostrado esta variabilidad genotípica por Ross y Grant (1985). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Colwel et al. (1979), los cuales sugerían que halobacteria era un grupo homogéneo. En este trabajo de Torreblanca se definieron claramente tres grupos taxonómicos distintos; e el **primer grupo** se enclavarían las especies *H. salinarium* (Larsen 1984) *H. saccharovarum*. Las características de este grupo son asimilables a las clásicas de halófilos extremos, como son: altos requerimientos salinos para un crecimiento óptimo y para mantener la estabilidad celular, pero no presentan un alto requerimiento de magnesio. Morfológicamente se

varillas usualmente delgadas y a menudo con vacuolas de gas. Presentan movilidad detectable al microscopio. Son fuertemente pigmentadas (color rojo), forman colonias pequeñas y sin una capa de mucosidad uniéndolas. El crecimiento es lento con tiempos de generación de 5 a 7 horas bajo las mejores condiciones. Metabólicamente son muy restringidas, requiriendo aminoácidos y factores de crecimiento, así como la utilización de un limitado rango de sustratos. Son ligeramente termófilas, con crecimiento óptimo a 45°C. Se encuentran en los hábitats de mayor concentración salina, muchos son proteolíticos, y a menudo se aíslan de pescado salado u otros materiales proteínicos preservados en sal. La composición lipídica de este grupo se caracteriza por la presencia de sulfato triglicosil diéter y sulfato tetraglicosil diéter. La denominación propuesta para este grupo es la de **Halobacterium**.

En el **segundo grupo** se incluirían tres especies diferentes *Hf.volcanii*, *Hf.mediterranei* y *Hf.gibbonoii* (Juez et al. 1986). Posee características muy diferenciadas del anterior. *Hf.volcanii* produce gránulos de reserva de poli-β-hidroxibutirato (PHB) y *Hf.mediterranei* puede acumular dichos gránulos de reserva cuando crece en medios con glucosa, llegando incluso a representar el 30% del peso seco. Generalmente se encuentran en concentraciones salinas intermedias (Rodríguez-Valera et al. 1985) donde también pueden estar presentes eubacterias halófilas. Metabólicamente no están restringidas, pudiendo crecer en medios mínimos con una fuente de carbono y nitrógeno. Los lípidos de este grupo se caracterizan por la presencia de sulfato diglicosil dieter y la ausencia de fosfatidil glicerol. Este grupo recibe la designación de **Haloferax**.

El **tercer grupo** se englobaría dentro del genero **Haloarcula** cuya especie más representativa es *Haloarcula californiae* (Torreblanca et al., 1986)

2.2.1.3. Metabolismo.

Las halobacterias por lo general son microorganismos quimioheterótrofos aerobios, es decir, utilizan materia orgánica como fuente de carbono y energía, siendo el O_2 el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. No obstante, en condiciones de iluminación y de baja presión de O_2 pueden comportarse como fototrofos (pueden realizar la fotofosforilación a través de la bacteriorrodopsina). No son capaces de crecimiento autotrófico (con CO_2 como única fuente de carbono), pero algunas pueden hacer una fijación no reductora del CO_2 a glicina en presencia de amonio y de propionato (Javor, 1988). No todas son aerobias estrictas: algunas pueden fermentar ciertos aminoácidos (Hartmann et al., 1980) y otras pueden realizar una respiración anaerobia teniendo como aceptor final de electrones el nitrato (Mancinelli y Hochstein, 1986)

Durante mucho tiempo se creyó que las halobacterias eran incapaces de metabolizar carbohidratos. Sin embargo, se ha demostrado que sí pueden hacerlo (Rodríguez-Valera et al., 1980; Pimenov et al., 1987). El catabolismo de las hexosas lo realizan a través de una modificación de la ruta de Entner-Doudoroff donde la glucosa es oxidada a gluconato y éste deshidratado a 2-ceto-3-deoxygluconato, posteriormente fosforilado dando 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato, continuando la vía normal de Entner-Doudoroff (Danson, 1992). En todas las archaeas la conversión de piruvato a acetyl-CoA está catalizada por la piruvato oxidorreductasa, que es distinta del sistema de la piruvato deshidrogenasa de eubacterias y eucariotas, en halófilos el aceptor de electrones es la ferredoxina utilizándose en lugar de NAD^+ (Danson, 1992). Los halófilos extremos son aeróbicos y organotrofos y el ciclo de los ácidos tricarbónicos que poseen es completo, es decir, idéntico o muy semejante al de eubacterias y eucariotas, sirviendo para generar energía y suministrar precursores para biosíntesis. También permite la utilización de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados como fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento (Danson, 1992).

2.2.1.4. Solutos compatibles y equilibrio iónico.

Los organismos que viven en ambientes hipersalinos hacen frente al problema osmótico acumulando los llamados "solutos compatibles"; éstos permiten igualar la actividad del agua a ambos lados de la membrana plasmática sin perturbar el metabolismo celular. Las halobacterias acumulan un soluto compatible iónico, el ión K^+ . La concentración intracelular de K^+ puede alcanzar un valor de 5 M (un 40 % del peso seco celular), varios órdenes de magnitud más alta que la concentración extracelular (Kushner, 1985). En cambio la concentración intracelular de Na^+ (alrededor de 1 M) es muy inferior a la del medio.

Se postuló la existencia de un transporte de intercambio (antiporte) H^+/Na^+ de membrana que bombea Na^+ al medio extracelular aprovechando el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria o por iluminación de la bacteriorrodopsina. Para mantener la neutralidad eléctrica, entran iones K^+ en la célula (Kushner, 1985). El gradiente de Na^+ que se establece sirve, entre otras cosas, para permitir el transporte de aminoácidos, ya que éste depende del co-transporte de Na^+ (Matveeva et al., 1987).

2.2.1.5. Lípidos de membrana.

Los lípidos totales de las halobacterias están constituidos por lípidos polares y no polares, los primeros representan el 90 % de los lípidos totales y son derivados del 2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol, es decir, cadenas alifáticas ramificadas de naturaleza isoprenoide unidas al glicerol por enlaces éter. Este tipo de lípidos son característicos de archaeas, ya que tanto en eubacterias como eucariotas los ácidos grasos se unen al glicerol mediante enlaces éster (Kamakura y Kates, 1988).

Los **lípidos polares** fosfo-derivados unidos por dos enlaces éter al núcleo isoprenoide se han encontrado en todas las archaeas, existiendo diferencias suficientes para poder distinguir los tres fenótipos (citados en el apartado 2.2.1.2) dentro del dominio archaea. En halófilos los grupos polares anclados al fosfato que los caracterizan son: glicerol (PG), glicerol sulfato (PGS) y glicerol fosfato (PGP). El PG está presente en todos los halófilos extremos y solamente se ha observado fuera de estos en las especies de metanosarcina y en *Methanospirillum hungatei* (Sprott, 1992). Recientemente se ha encontrado un derivado de PGP monometilado (PGP-Me), que probablemente es el componente mayoritario de los fosfolípidos de las archaeas halofílicas (Kates, 1992).

Los **lípidos no polares** consisten casi exclusivamente en compuestos isoprenoides, agrupándose en cuatro clases: C₂₀, C₃₀, C₄₀ y C₅₀-isoprenoide. Los ejemplos más importantes son el retinal (C₂₀), que es el principal lípido no polar de la membrana púrpura, y las bacteriorruberinas (C₅₀), que se encuentran en la membrana roja y tienen la función de proteger a la célula halófila de la intensa radiación luminosa característica de su hábitat (Kates y Kushwaha, 1978).

Los tipos de lípidos y sus proporciones varía mucho de una especie a otra y tienen un gran significado taxonómico (Tindall et al., 1984). Una de las características consideradas para separar las halobacterias en los distintos géneros, comentados anteriormente, ha sido la composición de los lípidos polares de sus membranas (Torreblanca M. et al., 1986). No solo los lípidos polares se pueden utilizar con propósitos taxonómicos en los distintos fenotipos de Archaea (Gambacorta et al. 1994), sino que conforme aumenta el conocimiento acerca de los distintos grupos de lípidos se podrían crear catálogos de lípidos para estos fines.

2.2.1.6. Envolturas celulares.

Las envolturas celulares de las archaeas son muy diversas, pero poseen un denominador común; la falta de mureína. La pared celular de *Halobacterium* está constituida por una glucoproteína ordenada hexagonalmente que parece ser esencial para el mantenimiento de la forma bacilar de estos microorganismos (Mescher y Strominger, 1976). El estudio de varias glucoproteínas de halobacterias ha permitido proponer un modelo general de composición y estructura (Kessel et al., 1988; Sumper, 1989) según el cual la glucoproteína, estaría constituida por una cadena peptídica (86 KD) con un dominio hidrofóbico C-terminal que se integra en la membrana celular (Lechner y Sumper 1987), unida a tres cadenas de azúcares de distinto tipo. El primer tipo es un azúcar complejo formado por unidades pentasacáridicas sulfatadas repetitivas, unido al polipéptido por un enlace N-glucosídico atípico; el segundo tipo son unos 10 oligosacáridos sulfatados unidos por otro tipo de enlace N-glucosídico también inusual; y el tercer tipo son aproximadamente 20 disacáridos no sulfatados unidos por enlaces O-glucosídicos (Lechner y Sumper, 1987). La agrupación de estos monómeros presenta simetría hexagonal, formando complejos en forma de cúpula de 4.5 nm de altura con un pequeño poro en el ápice que se abre hacia la membrana celular, proporcionando así una base estructural para la existencia de compartimientos que podría acomodar los enzimas implicados en diversos procesos. (Kessel et al., 1988).

La envoltura celular de *Haloferax mediterranei*, contiene también una glucoproteína aunque su estructura y composición no se han estudiado con detalle. Sin embargo, se sabe que posee una apariencia estructural diferente a *Halobacterium halobium* debido a su mayor grosor (Rodríguez-Valera et al., 1983), en lugar de la bicapa presenta una monocapa que aparece menos densa en la parte externa y carece de espacio periplásmico.

2.2.1.7. Genética de las halobacterias.

El genoma de las halobacterias puede separarse por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio en dos fracciones, una banda principal denominada FI , que comprende del 70 al 90 % del DNA total y es rica en G+C (62-71 %), y la banda satélite llamada FII, que es relativamente rica en A+T y su contenido en G+C es del 55-58 %. La fracción FII incluye principalmente DNA plasmídico pero también algún cromosoma de DNA que reciben el nombre de "islas" (Pfeifer y Betlach, 1985). FI está compuesta principalmente por DNA de secuencias únicas, mientras que el DNA de la fracción FII posee secuencias repetitivas y elementos de inserción (Eisenberg et al., 1992).

Una de las características que presentan las halobacterias en general, es una alta frecuencia de mutaciones espontáneas (10^{-4}). Esta inestabilidad genética está relacionada con la existencia de numerosos elementos de inserción o elementos ISH, que son secuencias móviles de DNA ricas en A+T, habiéndose detectado un número importante de estos elementos en mutantes de *H.halobium* (Simsek et al., 1982; Pfeifer, 1988; DasSarma, 1989).

Haloferax mediterranei es un buen modelo para estudios de organización genómica debido a que este género muestra una mayor estabilidad en la organización del DNA que el género *Halobacterium*, constituyendo un modelo en estudios de Biología Molecular en general. El análisis de diferentes elementos genómicos obtenidos con patrones de restricción de distintas endonucleasas reveló que estos microorganismos poseen un cromosoma circular de 2.9 Mb y al menos, 3 elementos extracromosómicos de 490, 320 y 130 kb respectivamente (López-García et al., 1992).

Un aspecto significativo es que no se han encontrado de forma natural transposones (elementos génicos móviles que pueden llevar uno o más genes aparte de los de transposición) en Archaea. Estos elementos son muy utilizados en genética bacteriana como herramientas eficientes, por ello se han construido transposones sintéticos para este dominio, que consisten en elementos ISH halobacterianos flanqueando a un determinado gen (Dyall-Smith y Doolittle, 1994).

Otra halobacteria cuyo genoma es muy estudiado es *Haloferax volcanii*, en la que su cromosoma ha sido mapeado en el 95 % (Lam et al., 1990).

2.2.2. PROTEÍNAS HALOFILICAS.

2.2.2.1. Efectos de las sales en la estructura.

Los halófilos extremos son los únicos organismos vivos que poseen concentraciones intracelulares de hasta aproximadamente 5 M de KCl (Christian & Waltho 1962; Ginzberg et al. 1970; Lanyi & Silverman, 1972; Ginzberg et al., 1978a,b; Kushner 1978). En estas condiciones citoplasmáticas se requieren proteínas con una dotación especial de aminoácidos para alcanzar una estructura funcional. La estructura tridimensional del esqueleto polipeptídico de las proteínas está altamente conservada (Rossman y Argos, 1978; Argos & Rossman, 1979; Matthews et al., 1981) a pesar de que presentan alteraciones significativas en la estructura primaria.

La composición de aminoácidos de las proteínas halofílicas muestra un incremento relativo en el uso de ácido glutámico y aspártico, con respecto a sus contrapartidas no halofílicas; al comparar la composición de proteínas ribosomales, también se ha observado la baja frecuencia en la que se encuentran los aminoácidos hidrofóbicos en los sistemas halofílicos

y la alta frecuencia de aparición de residuos hidrofílicos, como serina y treonina en la superficie de la proteína (Lanyi, 1974). Un mecanismo propuesto, (Lanyi y Stevenson, 1970; Lieberman y Lanyi, 1971; Higa y Cazzulo, 1975) se basa en el poder **salting-out** de ciertas sales como NaCl, sales que tienden a estabilizar la conformación nativa de los enzimas halofílicos más que las del tipo **salting-in**. Esta estabilización se produciría porque en presencia de sales tipo **salting-out**, las cadenas laterales de una proteína con grupos no polares pueden formar uniones hidrofóbicas estables.

Estas y otras observaciones sugirieron tres modos para la estabilización de proteínas halofílicas:

- (1) Aparición de un apantallamiento de carga en la molécula, inducido por el excesivo número de residuos ácidos, siendo efectivo después de la adición de sal en concentraciones superiores a 0.5-1 M. (Baxter, 1959; Lanyi, 1974).
- (2) Obligación de mantener cerrado el empaquetamiento de grupos no polares, marginalmente hidrofóbicos, inducido por la alta concentración salina (Lanyi, 1974,1979).
- (3) Mantenimiento de una capa de hidratación en la superficie de la proteína mediante la utilización de los grupos carboxilos de residuos ácidos, glutamatos y aspartatos. (Weber et al., 1978;Pundak & Eisenberg, 1981).

Pundak y otros autores (1980,1981) mostraron que malato y glutamato deshidrogenasas halofílicas altamente purificadas(Leicht & Pundak, 1981) presentaban una hidratación superior a lo normal en disoluciones salinas de alta molaridad. Cuando se disminuyó la concentración salina, las deshidrogenasas perdieron el empaquetamiento, y presentaron un estado de hidratación similar a las proteínas no-halofílicas. La correlación existente entre la integridad estructural de la proteína y las series de Hofmeister indicaba que las interacciones hidrofóbicas son un

de los principales modos de estabilización. Pundak también señaló que existía una relación lineal entre la temperatura y la estabilidad: cuando se incrementó la temperatura disminuyó la estabilidad de glutamato y malato deshidrogenasas, presentando entonces unos niveles de hidratación normales sobre la proteína desplegada. Esto hace inverosímil el que las interacciones hidrofóbicas desempeñen un papel principal en la estabilización de las proteínas halofílicas.

Una investigación teórica de las secuencias primarias de las proteínas halofílicas sugiere que estas proteínas son simplemente grandes aniones que compiten eficazmente con cualquier ión salino del ambiente por las moléculas de agua (Rao y Argos, 1981). La secuencia de ferredoxina de *H. halobium* es 22 residuos más larga que la ferredoxina de algas verde-azuladas; este fragmento extra contiene 9 residuos ácidos y no contiene residuos básicos.

El incremento en la hidratación y la unión a sales es una consecuencia de la adaptación halofílica, que se ha determinado directamente por medidas de densidad de masa, densidad electrónica y neutron-scattering length density. El sutil balance en la competición de la proteína y la sal por el solvente común (agua) está forzado por el requerimiento salino de las proteínas halofílicas; a bajas concentraciones de sal ocurre desactivación, desnaturalización y para oligómeros, disociación. Por ejemplo, para malato deshidrogenasa de *H. marismortui*, la estructura y estabilidad del enzima difiere para distintas disoluciones salinas sin detectarse alteraciones en la actividad catalítica. Así, en fosfato, estabilización e hidratación son similares a las presentadas por proteínas no-halofílicas, si bien en KCl, NaCl o MgCl₂ se observan uniones anómalas entre sales y agua. Obviamente bajo estas condiciones, la hidrofobicidad del núcleo de la proteína es insuficiente para estabilizar el plegamiento de la proteína y el principal mecanismo de plegamiento vendría dado por la formación de "enlaces hidratados cooperativos" entre la proteína y los iones salinos hidratados (Hecht & Jaenicke, 1989).

Con los datos disponibles sobre malato deshidrogenasa se ha propuesto un modelo en el cual la proteína posee un núcleo similar al de las proteínas no-halofílicas, y lazos que se extienden en el interior del solvente en donde tendría lugar la hidratación excepcional. Este modelo aún está lejos de ser demostrado con los datos disponibles de rayos-X de baja resolución.

También merece mencionarse que en lugar de la adaptación halofílica, en algunos casos se produce una síntesis de novo de "solutos compatibles con el disolvente", como glicerol, betaína, prolina, o azúcares, que pueden servir para combatir el estrés producido por la presión osmótica (Rainer, 1990,1991). Esta estrategia se ha descrito en un alga verde halotolerante, *Dunaliella* (Lee, et al., 1981).

2.2.2.2. Efecto de las sales en la actividad de los enzimas halofílicos.

En un principio se sugirió que el papel que desempeñan las sales en la actividad podía diferir del que realizan en la estabilización (Hubbard y Miller, 1969; Cazzulo y Vidal, 1972; Mevarech y Neumann, 1977). En algunos casos el enzima es inactivo en ausencia de sal y alcanza su máxima actividad en presencia de elevadas concentraciones salinas (Baxter, 1959); otros enzimas de halófilos extremos se activan por sal, presentando su máxima actividad a concentraciones de 0.5 M a 1.5 M y siendo parcialmente inhibidas por concentraciones más elevadas; otros se inhiben por concentraciones crecientes de sal, y en estos casos, si bien la actividad máxima se obtiene en presencia de una concentración salina muy baja, una parte de la actividad se conserva a concentraciones de 3 a 4 M (Cazzulo, 1975). La isocitrato deshidrogenasa de *H.salinarium* tiene una concentración óptima de 1.2 M para NaCl y entre 2-4 M para KCl (Baxter y Gibbons, 1956); en *H.cutirubrum* la concentración óptima era de 0.1 M a 0.4 M de NaCl (Higa et al., 1974). En *H.halobium* la glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente presenta un máximo de actividad a

3.2 M de NaCl y a 0.8 M de KCl, la NADP-dependiente tiene su óptimo a 1.6 M de NaCl y de KCl (Bonete et al., 1986); la dihidropoliámida deshidrogenasa de *Hf.volcanii* presenta una actividad óptima a una concentración de 1 M de NaCl (Vettakkorumakankav et al., 1991); así como la NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Hf. mediterranei* que presenta su óptimo a 0.5 M de NaCl (comunicación personal Bonete 1992). Se puede observar que en todos los ejemplos citados anteriormente la concentración óptima de la enzima está por debajo de la concentración salina a la que dichos organismos pueden desarrollarse.

La mayor parte de los enzimas estudiados responden prácticamente igual a KCl que a NaCl, las principales sales intra y extracelulares, respectivamente, mientras que otras presentan mayor actividad en presencia de KCl que de NaCl, tal y como cabría esperar de enzimas intracelulares. La piruvato quinasa de *H.cutirubrum* (de Médicis et al., 1982) fue más activa a concentraciones elevadas de KCl que NaCl. Por otro lado la NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* en la reacción de aminación del α -cetoglutarato, a elevadas concentraciones de sal, el enzima presenta mayor actividad en presencia de NaCl que de KCl; a bajas concentraciones presenta mayor actividad en presencia de KCl que de NaCl. En la reacción de desaminación ocurre lo mismo excepto que a altas concentraciones de KCl se observa un efecto de inhibición (Bonete et al., 1986). En malato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa de *H.cutirubrum* (Higa et al., 1974) y malato deshidrogenasa de *H.halobium* (Cadenas, 1985) se observa que son parcialmente inhibidas por altas concentraciones de NaCl o KCl.

Otras enzimas que requieren elevadas concentraciones de cationes monovalentes para su actividad pueden activarse a concentraciones mucho más bajas de cationes divalentes, tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc., o polivalentes, como espermina (Higa et al., 1974; Lanyi, 1974), como ejemplo se pueden citar la citrato sintasa (Cazzulo, 1973) y aspartato carbamoiltransferasa (Norberg et al., 1973) de *H.cutirubrum*.

2.3 GLUTAMATO DESHIDROGENASA.(EC 1.4.1.2-4)

2.3.1 PROPIEDADES CATALÍTICAS.

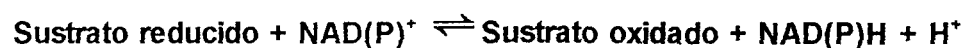
2.3.1.1 Actividad catalítica. Deshidrogenasas piridín dependientes.

En las células, se producen un gran número de reacciones de óxido-reducción catalizadas por enzimas que utilizan como coenzima NAD^+ o NADP^+ . Algunos de estos enzimas pueden funcionar con ambos coenzimas, como por ejemplo: glutamato deshidrogenasa de *Clostridium symbiosum* y bovina, otros sólo funcionan con uno u otro coenzima, actuando en este caso en diferentes aspectos del metabolismo.

Estos coenzimas se hallan unidos a la proteína de la deshidrogenasa de un modo relativamente débil durante el ciclo catalítico, y por ello funcionan más como sustratos que como grupos prostéticos. Los nucleótidos de piridina actúan de este modo como transportadores disociables de electrones.

En general, las deshidrogenasas que utilizan NAD^+ como coenzima, son enzimas catabólicos que producen energía e intervienen primordialmente en la respiración, mientras que las que utilizan NADP^+ participan principalmente en la transferencia de electrones desde los intermediarios del catabolismo hasta los intermediarios de la biosíntesis.

Estos enzimas catalizan reacciones del tipo:



Estas reacciones comprenden la transferencia reversible de dos equivalentes de reducción del sustrato en forma de un ión hidruro (H^-) a la posición 4 del anillo de nicotinamida (en forma oxidada) del nucleótido de

piridina; el otro hidrógeno se separa del sustrato en forma de ión H^+ libre. Esta transferencia directa de un átomo de hidrógeno desde el sustrato al NAD^+ se ha comprobado mediante el empleo de sustratos marcados con deuterio o tritio.

La forma oxidada y reducida del NAD^+ y del $NADP^+$ absorben luz en la zona del ultravioleta, cerca de los 260 nm, que es el máximo de absorción del anillo de adenina. Cuando estas coenzimas se reducen, aparece un nuevo máximo de absorción a 340 nm, este incremento refleja la reducción de la porción nicotinamida del anillo aromático de la piridina. La aparición o desaparición de la absorción a 340 nm se emplea para seguir el curso de las reacciones catalizadas por las deshidrogenasas piridín-dependientes.

Si se reduce el anillo de piridina por medios no enzimáticos el átomo de hidrógeno que es transferido al átomo de carbono 4 del anillo de nicotinamida puede aproximarse por ambos lados del anillo para dar cantidades iguales de las dos posibles formas estereoisómeras. Sin embargo, cuando el anillo de piridina se reduce enzimáticamente por una deshidrogenasa, el átomo de hidrógeno del sustrato es transferido estereoespecíficamente a un sólo lado del anillo. Así pues, podemos distinguir dos tipos de deshidrogenasas, unas que transfieren el hidrógeno al lado-A (estereoespecíficas-A)(pro-R) otras al lado-B (estereoespecíficas-B)(pro-S). Esto indica que tanto la molécula de sustrato como la del $NAD(P)^+$, deben poseer una orientación estereoquímica específica mutua en el centro catalítico del enzima.

Se ha analizado profundamente la estereoespecificidad de los enzimas, debido a que este aspecto es una de las propiedades más conservadas que poseen y además proporciona información fundamental para elucidar su mecanismo de acción (You, 1982). Se conocen las estereoespecificidades de más de 150 deshidrogenasas dependientes de

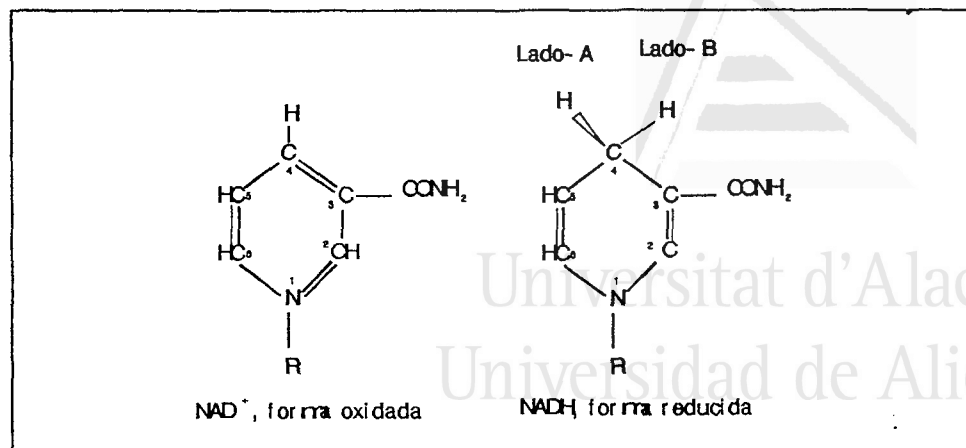


Figura 3.-En la forma oxidada, el átomo de hidrógeno de la posición 4 se halla en el plano del anillo de piridina; en la forma reducida los dos átomos de hidrógeno de la posición 4 están fuera del plano del anillo.

nucleótidos de nicotinamida. Enzimas como malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa o lactato deshidrogenasa presentan especificidad-A, mientras que glutamato deshidrogenasa presenta especificidad-B.

Podemos generalizar tres aspectos relacionados con la estereoespecificidad:

- La estereoespecificidad de una reacción es independiente de la fuente del enzima que la cataliza.
- Cuando un enzima puede utilizar tanto NADP^+ ó NAD^+ (o sus formas reducidas), la estereoespecificidad de la reacción es la misma con los dos coenzimas.
- Cuando un enzima reacciona con una gama de sustratos, la estereoespecificidad de la transferencia de hidrógeno es la misma con cada sustrato. (Görisch et al., 1985).

Las deshidrogenasas piridín-dependientes muestran el comportamiento cinético típico de las reacciones ordenadas bisustrato, en las que existe una secuencia obligatoria para la adición del sustrato y del coenzima al centro activo. El nucleótido piridínico es el sustrato conductor, y debe ser el primero en unirse al centro activo, incorporándose a continuación el

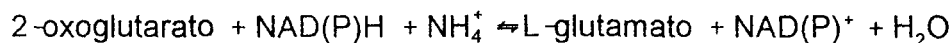
segundo sustrato. Después de la transferencia de equivalentes de reducción del sustrato al coenzima sobre el centro activo, el sustrato oxidado es el primero en liberarse, seguido del coenzima reducido.

Se ha obtenido importante información sobre la geometría del centro activo y el mecanismo de reacción de lactato deshidrogenasa, así como de los cambios conformacionales que ocurren en las moléculas de NAD⁺ y de NADH al unirse a la proteína, demostrándose que el hidrógeno se une en pro-R al C4 del anillo de nicotinamida (Deng et al. 1992; LaReau et al. 1992).

2.3.1.2 Actividad catalítica glutamato deshidrogenasa (GDH).

Glutamato deshidrogenasa (GDH) se ha extraído y purificado de una gran diversidad de fuentes como: bacterias, hongos, plantas y numerosos tejidos animales. Los enzimas difieren en términos cinéticos, metabólicos y propiedades moleculares. Las GDHs aisladas de tejidos animales, pueden emplear tanto NAD⁺ o NADP⁺ como coenzima y son fuertemente afectadas por nucleótidos de purina; las aisladas de otras fuentes suelen ser específicas de NAD⁺ o NADP⁺, y no son muy afectadas por nucleótidos de purina.

Las GDHs catalizan la interconversión de 2-oxoglutarato y L-glutamato según la reacción reversible:



En el enzima bovino la actividad catalítica no está restringida al ácido L-glutámico; el enzima puede catalizar la interconversión de otros ácidos α -amino a α -ceto análogos (Sund, 1968; Fisher, 1969).

Las glutamato deshidrogenasas proporcionan una ruta para la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos, estableciéndose una comunicación entre el metabolismo de carbohidratos y el de aminoácidos (Smith et al., 1975).

2.3.1.3 Especificidad de coenzima y distribución de glutamato deshidrogenasa.

Basándose en la especificidad de coenzima se conocen 3 tipos diferentes de glutamato deshidrogenasas; NAD-específicas (NAD-GDH), NADP-específicas (NADP-GDH, EC 1.4.14) y no específicas (funcionan con ambos coenzimas NAD(P)-GDH). Glutamato deshidrogenasa se ha estudiado en un amplio rango de organismos, desde bacterias a mamíferos, incluyendo humanos, algunas de estas se muestran en la Tabla I.1. Generalmente las GDHs procedentes de fuentes animales son del tipo no específico; mientras que las procedentes del resto de fuentes suelen ser coenzima-específicas; algunos organismos tienen ambos tipos de GDHs coenzima específicas mientras que otros sólo poseen un tipo. Esta gran variedad de GDHs responde de diferentes formas a la modulación por ligandos de bajo peso molecular, tal como nucleótidos de purina (ADP y AMP), Ca^{+2} y Mn^{+2} . En GDHs de animales y hongos se ha encontrado un control alostérico, en *Achlya klebsiana* glutamato deshidrogenasa es NAD-dependiente pero requiere NADP^+ para obtener su actividad óptima tanto en su reacción de desaminación oxidativa como en la de aminación reductiva (Yang y Léjohn; 1993).

Dentro del grupo de Archaeas, en termófilos como *Pyrococcus furiosus* se ha descrito una glutamato deshidrogenasa que utiliza ambos cofactores NAD^+ y NADP^+ (Robb et al., 1992), en *Thermococcus litoralis* glutamato deshidrogenasa es exclusivamente NADP-específica, no habiéndose detectado NAD-GDH específica (Kesen et al., 1994). En halófilos extremos como *Halobacterium salinarium* se ha aislado una GDH NAD-específica y otra NADP-específica (Bonete et al., 1987, 1989).

T A B L A I.1

Ejemplos de Glutamato deshidrogenasas aisladas de diversas fuentes y su especificidad de coenzima.^a En estos casos se han descrito dos enzimas una NAD-específica y otra NADP-específica. ^b Un enzima con especificidad por ambos sustratos.

ORGANISMO	COENZIMA	REFERENCIA
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NADP	Misono et al. 1985
<i>Phycomyces</i>	NAD	Van Laere 1988
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	NADP/NAD ^a	Janssen et al. 1980 Joanon et al. 1988
<i>Pandalus borealis</i>	NAD	Rouleau et al. 1991
<i>Laccaria lacata</i>	NADP	Brun et al. 1992
<i>Triticum durum L.</i>	NADP	Sultanbaev y col 1993
<i>Dictyostelium discoideum</i>	NAD	Pamula y Wheldrake 1991
<i>Clostridium symbiosum</i>	NAD	Syed et al. 1991
<i>Paracoccus denitrificans</i>	NADP	Kremeckova et al. 1992
<i>Azospirillum brasilense</i>	NAD(P) ^b	Hawkins et al. 1989
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	NAD	Hornby y Engel 1984
<i>B. fragilis</i>	NAD(P) ^b	Lyerly et al. 1991
<i>Halobacterium halobium</i>	NAD/NADP ^a	Bonete et al. 1987
<i>Pyrococcus furiosus</i>	NAD(P) ^b	Robb et al. 1992
<i>Nitrobacter agilis</i>	NAD/NADP ^a	Kumar y Nicholas 1984
<i>Thermococcus litoralis</i>	NADP	Kessen et al. 1994
<i>Haloferax mediterranei</i>	NADP	este trabajo

2.3.1.4 Unión coenzimas glutamato deshidrogenasa.

La glutamato deshidrogenasa más estudiada se ha aislado a partir de hígado bovino, en ella el número de sitios de unión del coenzima se ha discutido ampliamente. Frieden (1963) basándose en estudios cinéticos de estado estacionario propuso la existencia de dos sitios de unión para el coenzima por cadena polipeptídica (subunidad), uno el sitio activo y el otro el regulador. El sitio activo sería igualmente tan accesible por el NADH como por el NADPH, mientras que el NADH accedería con una afinidad superior al centro regulador (Krauser et al., 1974). Algunos estudios de la unión enzima-coenzima detectaron sólo un sitio de unión por cadena polipeptídica (Yielding y Holt, 1967; Churchich, 1967). Posteriormente se probó, por estudios directos de la unión, la existencia de dos sitios distintos para el NADH por subunidad, resultados obtenidos mediante técnicas de dicroísmo circular (Jallon y Iwatsubo, 1971). Uno, accesible por ambos coenzimas reducidos sería el sitio activo, y el otro sólo accesible por el NADH sería el sitio regulador; el sitio común para ambos coenzimas interactuaría con el sustrato L-glutamato, y el segundo sitio encontrado para el NADH interaccionaría con efectores alostéricos como GTP y Zn^{2+} , efectores que siendo totalmente diferentes producen los mismos efectos sobre la actividad catalítica y estructura cuaternaria del enzima.

En presencia de ADP la unión del coenzima al enzima (bovino) se reduce a una molécula de coenzima por cadena polipeptídica; limitándose a unirse sólo al sitio activo. Por métodos ópticos (Cross y Fisher, 1970) y estudios directos sobre la unión (Koberstein y Sund, 1973) se observó que el ADP competía con el coenzima por el sitio regulador. La presencia de ADP también disminuyó la afinidad del coenzima reducido por el enzima (Frieden, 1963). En contraste con el ADP y NADH, en presencia de GTP hay dos sitios de unión accesibles para el coenzima (NADH) (Kobertein y Sund, 1973).

En varios enzimas se ha descrito el sitio de unión del nucleótido como una región que contiene estructuras $\beta\alpha\beta$ (Wierenga et al. 1985). Entre los enzimas que unen NADP, por ejemplo, dihidrofolato reductasa y glutatión reductasa, se ha descrito la interacción de grupos básicos de esa región de la proteína con el grupo 2'-fosfato del coenzima. En dihidrofolato reductasa de *Lactobacillus casei* el residuo Arg-43 interacciona con el grupo 2'-fosfato. Esta arginina está conservada en otras especies o es reemplazada por lisina en la dihidrofolato reductasa de pollos y humanos (Birktoft y Banaszak, 1984). Kuroda et al. (1989) incluyeron a la glutamato deshidrogenasa de *E.coli*, en el grupo de enzimas que poseen una estructura $\beta\alpha\beta$ en la región de unión del coenzima. En glutamato deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium*, se observó la existencia de grupos básicos implicados en la unión del coenzima (NADPH) como es el caso de la Lys-286 que participa en la unión del 2'-fosfato del NADPH a la GDH (Haeffner-Gormley et al. 1992).

En NAD-glutamato deshidrogenasa de *C.symbiosum* se analizó la estructura tridimensional del enzima, describiéndose el sitio de unión del coenzima a la proteína. Esta posee un bolsillo donde se introduce el anillo de adenina y se forma un enlace de hidrógeno entre el N(3) de la adenina y el grupo γ -OH de la Ser-260. Esta estructura se conserva en las GDH hexaméricas de *E.coli*, *N.crassa* y *S.typhimurium*. Los grupos 2' y 3' hidroxilo de la ribosa están orientados hacia la superficie de la proteína, aproximándose el grupo 2'-OH al interior de una pequeña depresión formada por Pro-262 y Phe-238, estableciéndose un puente de hidrógeno con la cadena lateral de la Asn-289. Entonces el grupo 3'-OH forma otro puente de hidrógeno con el grupo NH de la cadena principal de la Phe-238 (Baker et al. 1992).



2.3.2 PROPIEDADES MOLECULARES.

2.3.2.1 Estructura.

Glutamato deshidrogenasa se ha aislado y secuenciado a partir de una gran variedad de fuentes y desde el punto de vista estructural todas ellas se pueden clasificar en dos clases oligoméricas. Las NADP-dependientes de bacterias y hongos y las GDHs de especificidad dual de vertebrados poseen seis subunidades iguales (hexámeros), con un peso molecular entre 48.000 Da. (Bacterias) y 55.000 Da. (vertebrados); por otro lado las NAD-dependientes suelen tener cuatro subunidades idénticas (tetrameros), con un peso molecular de 115.000 Da. (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) o seis subunidades con un peso molecular aproximado de 48.000 Da. (*Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Clostridium symbiosum*). La relación entre enzimas hexaméricas y tetraméricas no está clara. Pero sí existe una homología entre las regiones C-terminal de las hexaméricas (Baker et al. 1992).

Para *Clostridium symbiosum* se ha obtenido la estructura tridimensional de la proteína y la subunidad de glutamato deshidrogenasa (449 aminoácidos) está organizada en dos dominios separados por una profunda hendidura. El dominio I consiste en la porción N-terminal de la cadena polipeptídica (residuos 1 al 200) y los residuos comprendidos entre el 423 y el grupo C-terminal. El segundo dominio, dominio II, comprende a los residuos 201 al 366. Dos hélices alfa sirven para unir los dominios. En general toda la estructura posee 17 hélices α y 13 hojas β (Baker et al. 1992).

En el ensamblaje de las subunidades para formar un hexámero hay que considerar primeramente la formación de un dímero, posteriormente un trímero y un hexámero. Al estudiar la relación entre la asociación de subunidades y la función catalítica de la glutamato deshidrogenasa de hígado bovino, Strambini et al. (1989) concluyeron que el trímero es capaz de unir el coenzima. La integridad de la estructura secundaria/terciaria del dominio de unión del coenzima y posiblemente la conformación nativa del enzima, está mantenida principalmente por interacciones intrasubunidad más que por intersubunidad. El ensamblaje de las subunidades para formar un hexámero puede conferir una estructura suficiente para una sofisticada regulación pero no es estrictamente necesaria para la catálisis y no tiene por qué ser la unidad hexamérica la unidad catalítica más pequeña (Strambini et al. 1989).

En la formación del dímero aparece una parte con zonas que poseen un carácter hidrofóbico e hidrofílico entremezclados, lo cual permitiéndose la formación de interacciones antiparalelas. Para la formación del trímero se establece un puente salino entre un residuo de Asp-158(del dímero) y Arg-389 de la tercera subunidad, estos dos residuos se han conservado en esas posiciones en otras GDHs hexaméricas, como por ejemplo en *E. coli*, *S. typhimurium* y *Neurospora crassa*. El puente salino está rodeado por una zona con interacciones hidrofóbicas que a su vez está flanqueada por una región de contactos hidrofílicos. Dos trímeros se unen para formar un hexámero. En el hexámero hay una cavidad esférica de 11 Å de radio, cuya superficie está limitada por residuos hidrofílicos pertenecientes al C-terminal, y otros aminoácidos del dominio I (Baker et al., 1992).



2.3.2.2 Composición de aminoácidos.

En general en las proteínas halófilas se observa un alto contenido en aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico), apareciendo estos en la superficie de la proteína. Al analizar varias proteínas halófilas se ha encontrado que el contenido de Asp+Glu muestra una relación lineal con el contenido de Glu+Asp+Lys+Arg para las proteínas correspondientes no halófilas (Rao y Argos, 1981).

Al comparar la composición de aminoácidos de varias glutamato deshidrogenasas de *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Halobacterium salinarium*, bovina, etc., se puede observar la relación enunciada anteriormente por Rao y Argos, apareciendo un mayor número de aminoácidos ácidos (Asp y Glu) que en el resto de glutamato deshidrogenasas, asimismo el número de aminoácidos básicos (Lys y Arg) es menor en la GDH halófila que en las no halófilas y presenta un bajo porcentaje de residuos de Phe; en cuanto al resto de los aminoácidos no hay diferencias significativas en su contenido (Benachenhou y Baldacci, 1991).

2.3.2.3 Secuencia de aminoácidos.

La glutamato deshidrogenasa NAD-específica de *P. assaccharolyticus* muestra una mayor homología de secuencia con las GDHs bovina y de pollo, que poseen una especificidad dual de coenzima, que con respecto a la presentada por la NADP-GDH de *E.coli*. Esto es especialmente destacable debido a que la GDH de mamíferos posee una regulación alostérica por nucleótidos y la NAD-GDH de *P. assaccharolyticus* no (Snedecor et al. 1991).

En el organismo hipertermofílico ES4 (perteneciente al Dominio Archaea) la secuencia primaria de la glutamato deshidrogenasa presenta una homología del 40 al 50 % con un grupo de organismos que incluye *Clostridium difficile* (52%), *Halobacterium salinarium* (48 %), *Sulfolobus solfataricus* (40 %) y bovina (40 %), y sólo un 33 % con otro grupo que incluye *Clostridium symbiosum*, *E.coli* y *S.cerevisiae*. Su gen codifica 420 aminoácidos y la región de control es rica en AT, detectándose un promotor cuya secuencia es TTTATATA, denominado caja A, que es similar a la caja TATA de eucariotas y característico de las regiones promotoras de Archaeas. También se ha descrito la secuencia TGCA en el lugar de comienzo de la transcripción, secuencia característica del dominio Archaea (DiRuggiero et al., 1993).

El gen que codifica a la NADP-GDH de *Halobacterium salinarium* se transcribe en una única molécula de RNA con una longitud de 1700 nucleótidos, donde el extremo 5' posee las estructuras características de iniciación de transcripción (TGA) y secuencias promotoras (5'-ACACCTTAGA-3' situada a unos 25 bp del extremo 5', correspondiente a la secuencia consenso caja A) presentes en halófilos del dominio Archaea. Este gen codifica a un polipéptido de 435 aminoácidos, cuya secuencia muestra una mayor similitud con respecto a glutamato deshidrogenasas de eucariotas pluricelulares (concretamente un 39% de homología con la GDH bovina y un 38 % con la de pollo) que con respecto a GDH de eubacterias y eucariotas unicelulares, donde no sobrepasa el 29 % de homología (*S.cerevisiae* 29%, *E.coli*, *Neurospora crassa*, *Anacystis nidulans* un 27 % de homología) (Benachenhou y Baldacci, 1991).

En otros organismos también se han estudiado los genes que codifican a glutamato deshidrogenasa y, por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* el gen que codifica a la NADP-GDH está libre de intrones, sin embargo, en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* el gen para NADP-GDH posee dos intrones. En *Achlya klebsiana* (un Oomyceto) el gen que

codifica a la NAD-GDH posee 9 intrones y 10 exones. Este codifica a un polipéptido de 1063 aminoácidos y de 118.740 Da de peso molecular que se corresponde con el tamaño de la subunidad (Léjohn et al., 1994).

2.3.2.4 Centro activo.

Baker et al. (1992) utilizando la estructura tridimensional de la proteína propusieron un modelo para el centro activo de GDH NAD-dependiente. Tanto el glutamato como el 2-oxoglutarato poseen cargas negativas y parece ser que el enzima puede suministrar cargas positivas para estabilizar la unión del sustrato, como sugiere la conservación en la secuencia de residuos de Lys, Arg e His. Son siete los residuos que conservan su alineamiento en la secuencia de las glutamato deshidrogenasas hexaméricas, y además cuatro de estos (Lys89, Arg93, Lys113 y Lys125) están cerca del bolsillo donde se introduce el anillo de nicotinamida. El modelo de unión propuesto para el L-glutamato implica una conformación para el L-glutamato lo más extendida posible para éste y así maximizar la separación entre los grupos carboxilos C1 y C5, (independientemente de que al unirse el sustrato al enzima pueda haber cambios conformacionales en la proteína y así alcanzar las distancias óptimas). En este modelo el carboxilo C1 quedaría a una distancia de 3 a 3.5 Å de los grupos $-NH_3^+$ de la Lys113 y Lys125 mientras que el carboxilo C5 está a una distancia similar del $-NH_3^+$ de Lys89, del γ -OH de Ser379, y del γ -OH de Thr193. El grupo 2-amino del glutamato está a una distancia aproximada de 4.0 Å del grupo carbonilo de la cadena principal de Gly164, además, las cadenas laterales de Val376 y Ala163 producen interacciones hidrofóbicas con el C3, C4 y C5 del glutamato. Todos estos residuos se han conservado en la secuencia de las GDHs hexaméricas, con excepción de la Gly164, que en algunos casos es prolina. Este modelo sitúa al $C\alpha$ del glutamato a 6.3 Å del carbono C4 del anillo de nicotinamida quien va a proporcionar el protón que será utilizado en la catálisis. Claramente se requiere un cambio conformacional para situar el anillo de nicotinamida lo

suficientemente cerca del sustrato para la catálisis (Baker et al., 1992).

2.3.3 Regulación de la síntesis.

Vierula y Kapoor (1986) reseñaron que la síntesis de la glutamato deshidrogenasa NAD dependiente en *Neurospora crassa* está sometida principalmente a una represión por catabolito. Demostraron que durante la desrepresión se producía síntesis de novo de la subunidad de NAD-GDH y que la desrepresión estaba regulada a nivel transcripcional. Debido a que *N. crassa* registraba una respuesta brusca frente a los cambios en el medio extracelular, propusieron que esta represión por catabolito debía estar mediada por un sistema unido a membrana, análogo al sistema adenilato ciclasa de *E. coli* y otros procariotas (Vierula y Kapoor, 1986).

La actividad NADP-GDH de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyó bajo condiciones en las que la concentración intracelular de amonio aumentaba, en respuesta a un incremento del nivel de amonio en el medio de cultivo. Esta disminución en la actividad se debió a una represión de la síntesis de la subunidad NADP-GDH (Bogóñez et al. 1985). En raíces y cotiledones de *Citrullus vulgaris* L. también se ha descrito el efecto del amonio como un incremento de la actividad NADH-GDH, debido a un aumento en la síntesis proteica tanto organular como citoplasmática, mientras que en las raíces sólo se producía un aumento en la síntesis a nivel organular. Al suministrar nitrato se observó una reducción en la actividad; en cotiledones este efecto parece ser debido a una disminución en la síntesis proteica actuando como un regulador negativo de la síntesis de NADH-GDH (González-Bravo y Maeso, 1986). Loulakakis y Roubelakis-Angelakis (1991) encontraron en *Vitis vinifera* L dos isoenzimas, una para la reacción de aminación y otra para la reacción de desaminación de la glutamato deshidrogenasa, que denominaron subunidad α y subunidad β respectivamente. En la reacción de aminación determinaron que la actividad de la NADH-GDH aumentaba cuando se transferían nódulos de

la planta a un medio conteniendo amonio. Este incremento en la actividad enzimática era paralelo a un aumento en la cantidad de proteína GDH en la subunidad α , a la vez que decrecía la actividad en el sentido de desaminación y la cantidad de proteína GDH de la subunidad β . Utilizando ^{32}S -metionina y detección inmunoquímica demostraron que la velocidad de síntesis de la subunidad α se incrementaba considerablemente cuando en el medio había amonio, y no era detectable la síntesis de la subunidad β . Estos resultados indicaban que el aumento de actividad NADH-GDH en la reacción de aminación era debido a una síntesis de novo de la proteína (Loulakakis y Roublakis-Angelakis, 1991).

En *Corynebacterium callunae* los niveles de NADPH-GDH disminuían si las células se hacían crecer en medios cuya principal fuente de carbono eran intermediarios del ciclo de Krebs, esto ocurría cuando la concentración de amonio en el medio era de 2 mM a 10 mM, pero cuando ésta era muy elevada, del orden de 100 mM, no se producía ningún efecto sobre los niveles de enzima (NADPH-GDH) (Ertan, 1992).

En *Achlya klebsiana* (Oomyceto), se demostró que al aumentar los niveles de L-glutamina en el medio, se producía un aumento en la actividad NAD-GDH relacionado con un aumento en los niveles de proteína y en los niveles del fragmento de transcripción que codifica al enzima, indicando que aumentaba la síntesis de novo de la NAD-GDH (Léjhon et al., 1994).

2.3.4 Evolución de glutamato deshidrogenasa.

El análisis de homología de secuencias entre glutamato deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa y fenilalanina deshidrogenasa indica que elementos de estructura secundaria correspondientes al núcleo de dos dominios de glutamato deshidrogenasa se han conservado en los otros dos enzimas, estos residuos son responsables del reconocimiento del anillo de nicotinamida del coenzima y de cooperar en la unión del sustrato

L-aminoácido. Además, también se conservan los residuos implicados en adquirir una nueva disposición conformacional para una mejor unión del sustrato, así como los implicados en la catálisis química. Los patrones de inserción/delección entre estos enzimas son consistentes con posibles diferencias en la estructura cuaternaria. Todo ello apuntaría a un posible origen común. Las diferencias entre la especificidad del sustrato L-aminoácido estaría representada por sustituciones críticas en el bolsillo de unión donde se acomoda la cadena lateral del sustrato aminoácido (Britton et al., 1993).

Benachenhou-Lahfa et al. (1993) propusieron la existencia de dos familias de genes que codifican a glutamato deshidrogenasas hexaméricas. Llegaron a esta conclusión al analizar 21 secuencias primarias y determinar la similitud entre cada par de proteínas. Una familia (**Familia I**) está compuesta por genes de GDH procedentes de eubacterias y eucariotas simples (*Giardia lamblia*, primitivo protozoo, *Chlorella sorokiniana*, alga verde, y distintos hongos y levaduras). La otra familia (**Familia II**) está compuesta por genes de GDH procedentes de dos eubacterias, dos archaeas y cinco eucariotas superiores (vertebrados).

La secuencia del gen de GDH de *Halobacterium salinarium* presentó cierta semejanza con la de otras GDH hexaméricas, pero sorprendentemente estuvo más cerca de los genes correspondientes a vertebrados que a los de eubacteria y eucariotas sencillos (hongos y levaduras).

La existencia de estas dos proteínas parálogas (GDH) reforzó la hipótesis propuesta por Benachenchou y Baldacci 1991, en la que dos formas de proteínas hexaméricas de glutamato deshidrogenasas habrían existido en un antecesor común a los diferentes Dominios. Otra posible explicación de la existencia de estas dos proteínas parálogas sería que el gen que codifica GDH en la familia II correspondería a un gen ancestral producto de la duplicación del gen de la familia I, que después evolucionó rápidamente, transfiriéndose de un Dominio a otro.

2.3.5 Aplicaciones.

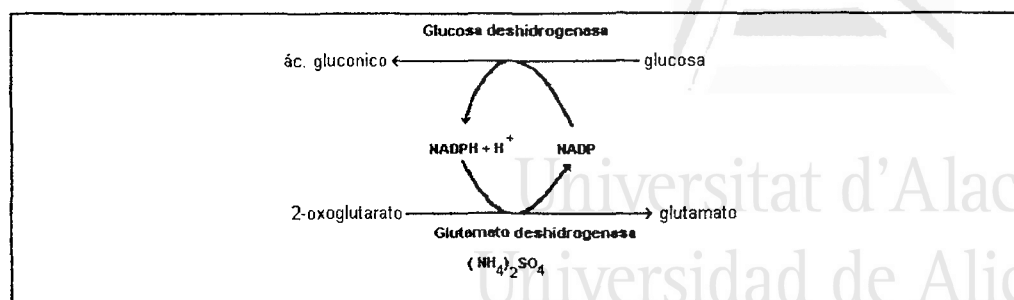
En todas las aplicaciones comerciales e industriales hay que tener en cuenta la economía y eficacia del sistema a comercializar. Actualmente la biotecnología está siendo aplicada a multitud de industrias: alimentaria, farmacológica, médica, medio ambiental, etc., resultando dichas aplicaciones enclavadas dentro de estos dos parámetros de eficacia y economía. Aquí se citan algunas de dichas aplicaciones concretas de glutamato deshidrogenasa.

La primera de ellas es una aplicación biomédica, el ácido glutámico está considerado como un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central de mamíferos, sospechándose que juega un papel significativo en la etiología y patofisiología de diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, lo que ha generado un interés extra por el estudio de dicho aminoácido; por ello se han incrementado los esfuerzos encaminados al desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación de ácido glutámico en volúmenes de muestra muy pequeños. Estos métodos incluyen medidas enzimáticas con glutamato oxidasa y glutamato deshidrogenasa, solas o en combinación con otras enzimas, además de HPLC y cromatografía de gases unida a espectrometría de masas. Dos de estos métodos recientemente desarrollados se basan en la inmovilización de estas enzimas en una matriz; la glutamato oxidasa fue inmovilizada en lechos de vidrio no poroso y la glutamato deshidrogenasa se inmovilizó en vidrio poroso, empleando estos soportes para la construcción de reactores de corriente de lecho simple y reactores de lecho empaquetado, unidos a sistemas de análisis de inyección de flujo con detección fotométrica o fluorométrica. Comparados con los métodos de HPLC, estos ofrecen simplicidad y bajo costo siendo susceptible su utilización en análisis rutinarios de gran número de muestras (Stalikas et al., 1994).

Otro de los ejemplos es la utilización en la industria para la síntesis quiral de metabolitos estándar, concretamente la glutamato deshidrogenasa estaría implicada en la síntesis de L-glutamato. El procedimiento más ampliamente usado para la síntesis de aminoácidos marcados con ^{15}N se basa en la reacción de amonio o un equivalente de éste con un α -halo éster. El amonio, generalmente no se usa debido a su tendencia a dar alquilaciones múltiples. En cambio, se usa más comúnmente el potasio de talimida, donde previamente se ha de realizar la conversión del amonio marcado con ^{15}N en talimida. En la síntesis de aminoácidos, la incorporación de amonio marcado con ^{15}N puede efectuarse directamente mediante dos procedimientos: la reacción de Strecker y la aminación reductiva del α -ceto ácido conjugado. En ambos casos es impracticable la conversión completa en presencia de compuestos equivalentes de amonio enriquecido.

De todos modos, cualquiera de los procedimientos antes mencionados presenta varias limitaciones obvias, todos ellos producen generalmente mezclas racémicas y normalmente sólo se necesita la forma L. También se han desarrollado procedimientos de síntesis estereoelectivos, pudiendo introducir casi cualquier grupo en el carbono alfa. Pero ninguno de ellos son particularmente eficaces para introducir un nitrógeno marcado isotópicamente en dicho carbono.

La catálisis enzimática ofrece una alternativa para la síntesis quiral de metabolitos estándar. En el caso del método propuesto por Chanatry et al. (1993) muestra la obtención de aminoácidos marcados con ^{15}N de una forma eficiente y económica, teniendo como única limitación la disponibilidad comercial de α -ceto ácidos. Este método acopla dos reacciones enzimáticas; en el caso de la glutamato deshidrogenasa se puede obtener glutamato marcado con ^{15}N en forma L a partir de sulfato amónico marcado y 2-oxoglutarato, y para recuperar el NADPH se utilizaría el sistema glucosa deshidrogenasa.



Estos dos sistemas tienen la ventaja de que su pH óptimo es próximo a 8.5 y trabajan en tampón Tris. Este se emplea a una concentración de 0.2 M, lo cual supone una elevada fuerza iónica utilizada para compensar la liberación de H⁺ durante la conversión de glucosa a ácido glucónico por el sistema de regeneración del NADPH (Chanatry et al. 1993). Estos autores acoplan otra reacción para la obtención de aminoácidos α,β deuterados además de marcados con ¹⁵N en el amino.

Otro ejemplo es la utilización de sistemas multienzimáticos para la fabricación de biosensores. La combinación de la alta especificidad de la catálisis enzimática unido a la simplicidad de detectores amperiométricos, permite la creación de sensores de bajo coste con aplicación en biotecnología, medicina o en medio ambiente.

Los biosensores son dispositivos que pueden detectar o responder a ambientes químicos que van a interactuar con un componente biológico sensible, que está en contacto con un transductor físico. El componente biológico transforma el reconocimiento molecular específico de una sustancia a un parámetro químico o físico fácilmente medible. Este cambio es registrado por el transductor que genera a su vez una señal eléctrica. El reconocimiento específico de sustancias generalmente se produce por enzimas, células, orgánulos, tejidos, receptores, anticuerpos o antígenos. Los transductores más frecuentemente utilizados son electroquímicos, ópticos y térmicos. Normalmente los biosensores

comerciales están basados en métodos electroquímicos que utilizan enzimas. Estos electrodos enzimáticos están basados en la oxidación o reducción de especies redox en la superficie del electrodo, el cual se mantiene a un potencial eléctrico apropiado. La conversión catalítica específica de la sustancia a analizar, produce o consume compuestos activos redox, de tal manera que esto genera una relación estequiométrica con la concentración de dicha sustancia.

En la naturaleza sólo unos pocos enzimas pueden generar o consumir especies electroquímicamente activas, esto limita el número de sustancias que pueden ser medidas con electrodos mono-enzimáticos. Una vía para soslayar este problema es el acoplamiento de varios sistemas enzimáticos. Existen diversas estrategias para llevar a cabo este acople, unas se basan en medir metabolitos intermedios, otras en explotar el principio de cascada enzimática, otras en reciclar la sustancia a medir y amplificarla (esta estrategia es útil en el caso de que se quieran medir sustancias que se encuentran en muy baja concentración) y otras estrategias están basadas en reacciones cíclicas, como cuando se acoplan oxidasas y deshidrogenasas. En este último caso se encuadraría la glutamato deshidrogenasa; para medir concentraciones de glutamato se podría utilizar un sistema enzimático acoplado de glutamato oxidasa y glutamato deshidrogenasa inmovilizadas en una matriz unida a un electrodo de O₂ que sería el transductor (Wollenberger et al., 1993).

En todos estos ejemplos el enzima tiene que estar inmovilizado a una matriz y es de suma importancia el que pueda resistir cierta variabilidad de las condiciones de ensayo, como por ejemplo temperaturas de 50°C, o un aumento de temperatura puntual del reactor que la contenga, o cambios en el pH, etc.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES.

Todos los reactivos usados en el presente trabajo fueron de grado analítico, siendo utilizados directamente sin ningún tipo de purificación.

- **Organismo.** Las colonias de *Hf. mediterranei* fueron suministradas por el Dr. D. Fco. Rodríguez Valera, director del Departamento de Microbiología, de la Universidad de Alicante.

- **Medio de cultivo.** Las sales fueron proporcionadas por la firma comercial PANREAC; la glucosa, galactosa y piruvato por la firma MERCK. Glutámico por SIGMA CHEMICALS Co.

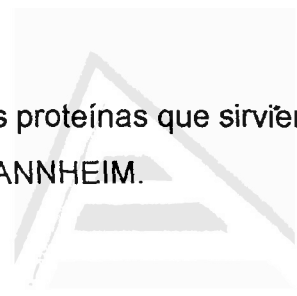
- **Soportes cromatográficos.** Los geles de Sepharosa 4B, Sephadex G-100 y Sepharosa CL-6B fueron suministrados por la casa PHARMACIA FINE CHEMICALS. DEAE-celulosa e Hidroxiapatito a la casa SIGMA CHEMICALS Co.

- **Determinación de proteína.** El azul comassie G-250 fue adquirido a la firma MERCK.

- **Electroforesis.** Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED y el SDS, fueron suministrados por la casa Bio-Rad. El Azul Coomassie R-250, el persulfato amónico y 2-mercaptoetanol, por la casa MERCK y el nitrato de plata por la casa PROBUS.

- **Determinación de la actividad enzimática:** Los coenzimas NADPH y NADP⁺ fueron obtenidos de la casa BOEHRINGER MANNHEIM; el 2-oxoglutarato sódico y el acetato amónico e hidroxilamina de MERCK y el L-glutamato y glutarato de SIGMA CHEMICAL Co.

- **Determinación del Peso molecular:** Las proteínas que sirvieron de patrones fueron de la firma BOEHRINGER MANNHEIM.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



3.2 MÉTODOS.

3.2.1 Medio de cultivo.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó una disolución de sales inorgánicas (agua de sales) que mantiene las proporciones relativas del agua de mar artificial (Subov, 1931), excepto para NaHCO_3 y CaCl_2 , que conservan la concentración normal del agua de mar (Rodríguez-Valera et al., 1980). La composición del agua de sales con una concentración del 25% (%p/v) es la siguiente:

NaCl	19.5 %
MgCl_2	1.62 %
MgSO_4	2.01 %
CaCl_2	0.092 %
KCl	0.5 %
NaHCO_3	0.017 %
NaBr	0.058 %

El microorganismo se hizo crecer tanto en medio sólido como líquido, distinguiéndose dos tipos de medios desde el punto de vista nutricional:

- a) Medio mínimo.
- b) Medio complejo.

El medio mínimo contenía: agua de sales al 25 %, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0005 %; KH_2PO_4 , 0.05 %; una fuente de nitrógeno 0.2 %, y una fuente de carbono 1-2 %; usualmente la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, cloruro o sulfato, y la de carbono glucosa (Rodríguez-Valera et al., 1983).

El medio complejo estaba formado por agua de sales al 25 % y extracto de levadura (Difco) al 0.2-2 %, dependiendo la proporción del

estudio realizado. Normalmente se utilizó una concentración del 0.5% para obtener una gran cantidad de células.

El medio sólido se usó para mantener la cepa. Los componentes de las placas fueron los mismos que para el medio líquido, además de un 2% de Bactoagar de (Difco) y 0.5% de extracto de levadura.

Los medios líquidos se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos empleando un autoclave P Selecta, Autester, modelo 437-G, excepto si el medio es mínimo, en cuyo caso la fuente de carbono se esterilizó aparte, mediante filtración con filtros Millipore de 0.5 µm tamaño de poro.

3.2.2 Mantenimiento de la cepa.

La cepa de *Haloferax mediterranei* (R-4) se conservó en placas petri, con medio sólido a pH de 7 a 7.3 y a una temperatura de 6 a 8°C en cámara fría. Las células también se conservaron a -20°C y en glicerol, siendo utilizadas posteriormente como inóculo.

3.2.3 Precultivo y Cultivo.

A partir de las células en medio sólido se realizó un precultivo en medio líquido, en un erlenmeyer con 100 ml de medio, haciéndolas crecer a 37°C en un incubador con agitación (120 rpm) hasta que alcanzaron la fase exponencial, seguidamente se añadieron a un erlenmeyer de 1.5 l conteniendo el mismo medio para que el crecimiento en este último fuese más rápido.

3.2.4 Extracto bacteriano.

El crecimiento de las células se monitorizó extrayendo alícuotas cada cierto tiempo y midiendo la absorbancia a 680 nm en un

espectrofotómetro Spectronic 2000 de la casa BAUSCH & LOMB. El cultivo se detuvo cuando el crecimiento comenzaba a entrar en fase estacionaria. Las células se cosecharon en una centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21, con rotor de ángulo fijo tipo JA-14, a 9600g (10000 rpm) durante 30 minutos, desechándose el sobrenadante.

3.2.5 Obtención del extracto crudo.

Las células se pesaron y se resuspendieron en tampón fosfato 0.05 M de pH 6.6 que contiene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 M hasta una concentración final del 20 % (p/v). La rotura de las células se efectuó por un medio mecánico como los ultrasonidos, con un sonicador Branson Sonifier (modelo B-12) con sonda de titanio de 12.7 mm de diámetro y de 150w de potencia, sumergiendo éstas en un baño de hielo y sonicando con pulsos de 3 minutos (una media de 6 pulsos para obtener una buena cantidad de células rotas, estimación obtenida por la cantidad de proteína en el extracto), e intervalos de reposo para restablecer el equilibrio térmico. La suspensión sonicada se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman, modelo L5-65B, con rotor de ángulo fijo tipo 35, durante una hora a 105000g (30000rpm). El sobrenadante obtenido sirve como fuente de glutamato deshidrogenasa (GDH).

3.2.6 Determinación cuantitativa de proteína.

Se llevó a cabo utilizando el método de Bradford propuesto en 1976. Este método es fácilmente utilizable cuando hay que procesar un gran número de muestras, incluso es susceptible de automatización. Se basa en la observación de que el Azul Coomassie brillante G-250 existe en dos formas diferentes de color, rojo y azul. El rojo se convierte en azul cuando se une a la proteína. El complejo proteína-colorante posee un alto coeficiente de extinción que permite una gran sensibilidad en la medida de proteína. La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido

(aproximadamente 2 min.), una vez formado el complejo tarda aproximadamente una hora en dispersarse, resultando un método rápido y sin tiempos críticos de ensayo.

Existen dos tipos de ensayo dependiendo de la cantidad de proteína, el método estándar y el microensayo. El método estándar se utiliza para disoluciones de proteínas que contengan de 10 a 100 μg de proteína en un volumen de 0.1 ml. Se pipetea un volumen de 0.1 ml de proteína y se añaden 5 ml del reactivo de ensayo, se preparan controles donde se sustituye la muestra de proteínas por tampón, la solución se mezcla mediante agitación o inversión. La absorbancia se mide a 595 nm después de 2 min de la preparación y antes de una hora, frente a un blanco preparado con 0.1 ml de tampón y 5 ml de reactivo de ensayo.

El microensayo de proteína se utiliza para disoluciones que contienen de 1 a 10 μg de proteína en un volumen de 0.1 ml. A 0.1 ml de la disolución de proteína se le añade 1 ml del reactivo y el contenido es mezclado tal como se ha descrito en el método estándar. Posteriormente se mide la absorbancia a 595 nm frente a un blanco realizado con 0.1 ml de tampón y 1 ml de reactivo. En este caso se utilizan cubetas de plástico de 1 ml donde se realiza la reacción y la medida.

Se determinó la concentración de proteína de una muestra desconocida, mediante la correspondiente curva de calibrado construida utilizando albúmina de suero bovino fracción V (Sigma Chem. Co.) como proteína patrón, y los puntos experimentales se ajustaron mediante regresión lineal.

Reactivo: 100 mg de Azul Coomassie brillante G-250 se disuelven en 50 ml de etanol al 95%. A esta disolución se añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (p/v). La disolución resultante es diluida a un volumen final de 1 litro. La concentración final del reactivo es de 0.01 % (p/v) para el

Azul Coomassie brillante G-250, 4.7 % (p/v) etanol y 8.5 % (p/v) ácido fosfórico.

Para el microensayo la sensibilidad obtenida con este método es de 5 µg proteína/ml (Bradford M.M., 1976).

3.2.7 Determinación de actividad enzimática.

Se cuantificó la actividad en el sentido de aminación reductiva (síntesis de glutamato) en un volumen total de 2 ml, con tampón Tris-HCl 20 mM de pH 8.5, conteniendo EDTA 2 mM y, en el caso de medidas en presencia de sal con 2 M de NaCl. Las concentraciones finales de los sustratos en la cubeta de reacción fueron: acetato amónico 100 mM, NADPH 0.15 mM y 2-oxoglutarato 20 mM. La temperatura se mantuvo a 40° C con un baño termostático de circulación de agua conectado al espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bausch & Lomb), equipado con un programa para la determinación de cinéticas enzimáticas. Se monitorizó la oxidación del NADPH a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.3 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un µmol de sustrato por minuto en las condiciones de ensayo.

3.2.8 Purificación de glutamato deshidrogenasa.

3.2.8.1 Cromatografías

Para la purificación de la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente se realizaron las siguientes cromatografías:

- Cromatografía en Sepharosa-4B en gradiente de sulfato amónico.
- Cromatografía en DEAE-celulosa
- Cromatografía en Hidroxiapatito

- Cromatografía en Sepharosa-CL-6B.

Todas estas cromatografías se detallan en el capítulo de purificación.

3.2.8.2 Electroforesis.

Para determinar el grado de purificación del enzima se efectuaron electroforesis analíticas de las distintas fracciones obtenidas a lo largo de los pasos de purificación. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica también se utilizó para determinar el peso molecular de la subunidad proteica. La realización de las electroforesis se llevó a cabo con un equipo Miniprotean II (Bio-Rad).

Teniendo en cuenta los pesos moleculares entre los que oscila la glutamato deshidrogenasa aislada en otros organismos, se usaron geles de poliacrilamida del 7.5, 10 y 12 %, para obtener el grado de reticulación más idóneo para la resolución de dichas proteínas, eligiendo la relación del 10 % como la más adecuada para nuestra proteína (Laemmli et al. 1970).

En la Tabla ME.1 se muestran las disoluciones y las proporciones en que deben mezclarse cada uno de los componentes para la obtención de los geles de separación. En la tabla ME.2 se muestra las cantidades para el gel concentrador (4%).

La disolución de Acrilamida/Bis (30 %) está preparada del siguiente modo:

Acrilamida a una concentración 29.2 % (p/v)

N'N'-Bis-metilén-acrilamida 0.8 % (p/v)

Esta disolución puede ser almacenada durante 30 días máximo a 4°C en oscuridad.

Tabla ME.1: Preparación gel separador de poliacrilamida.

	12 %	10 %	7.5%
Agua destilada ultrapura	3.35 ml	4.00 ml	4.85 ml
Tris- HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10 %(p/v)	100 µl	100 µl	100 µl
Acrilamida/Bis (30%) (Degasificada >15 min)	4.0 ml	3.35 ml	2.5 ml
Persulfato amónico 10 %	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Tabla ME.2:

Preparación gel concentrador de poliacrilamida 4%, Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8

	4%
Agua destilada ultrapura	6.1 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10 % (p/v)	100 µl
Acrilamida/Bis (30 %) Degasificada >15 minutos.	1.3 ml
Persulfato amónico 10 %	50 µl
TEMED	10 µl

El tampón de electrodo pH 8.3 fue:

Tris base	15 g/l
Glicina	72 g/l
SDS	5 g/l

En el momento de realizar la electroforesis una fracción de dicho tampón se diluyó 5 veces.

La muestra se preparó precipitando un volumen de disolución de proteína con otro volumen igual de acetona previamente enfriada a -20°C . La mezcla resultante se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. en una microcentrífuga (modelo Biofuge 13 de Heraeus), se eliminó el sobrenadante, se lavó con éter y se dejó secar al aire. Se le añadió el tampón de la muestra diluido 1:4 y se calentó a 95°C durante 4 minutos.

Tampón para preparación de la muestra:

Agua destilada	4.0 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS. 10%(p/v)	1.6 ml
2-mercaptoetanol	0.4 ml
Azul de Bromofenol 0.05 %(p/v)	0.2 ml
VOLUMEN TOTAL	8.0 ml

Condiciones de electroforesis.

Se usó un tamaño de geles de 7.3 cm x 10.2 cm donde se aplicaron muestras de 10 μl de disoluciones de proteína próximas a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, introduciendo los geles en el tampón de recorrido diluido, aplicándose una corriente de 200 V (30 mA) mediante una fuente Electrophoresis Power Supply EPS 500/400 de Pharmacia.

Los geles se fijaron y tiñeron siguiendo el método propuesto por DeMoreno et al. (1985). Este permite combinar una primera tinción con Azul Coomassie G-250 y un segunda con plata para mayor resolución, siendo los pasos a seguir:

1- Sumergir el gel tres veces durante 20 min. en una disolución de metanol 40%-acético 10% (v/v).

2- Teñir con Azul Coomassie G-250 0.25% (p/v) en metanol 50%/ TCA 12.5% durante 30 minutos.

3- Desteñir con un disolución de TCA 5% tres veces durante 10 min cada vez.

4.- Sumergir durante dos intervalos de 10 min. en una disolución metanol 40%-acético 10%.

5.- Sumergir dos veces en etanol 10 %-acético 5% (v/v) durante 10 min. cada vez (De Moreno et al. 1985).

Cuando se requirió una sensibilidad mayor en la detección de proteína se siguió el método de tinción con plata de J.M. Moorisey (1981), cuya sensibilidad es 100 veces mayor que en la tinción con azul Coomassie pudiendo detectarse fácilmente bandas que contengan entre 10 y 100 ng de proteína.

La placa teñida previamente con Azul Coomassie se lavó sucesivamente con agua hasta alcanzar un pH de 7. A continuación se procedió según el siguiente protocolo :

1.- Se sumergió la placa en 200 ml de una disolución de ditioneol (DTT) del 5×10^{-4} % (p/v) durante 30 min.

2.- Para la coloración se introdujo la placa en 200 ml de AgNO_3 al 0.1% (p/v) durante 30 min.

3.- Se lavó la placa con 50 ml de agua durante 5 seg.

4.- El revelado se realizó sumergiendo la placa en 50 ml de la disolución reveladora (30 g de Na_2CO_3 en 1 l. de agua más 0.5 ml de formaldehído) durante aproximadamente 5 seg. Este paso se repitió las veces necesarias hasta que se observó la placa teñida de marrón.

5.- Para detener la coloración se introdujo la placa en una disolución de 10 ml de ácido cítrico 2.3 M durante 10 min.

6.- Se realizaron tres lavados con 200 ml de agua de 10 min. de duración cada uno.

Los geles se conservaron en papel celofán:"Gel Drying film" de

Promega que previamente se mantuvo durante 5 min. en una disolución de metanol 40% - ácido acético 10 %.

3.2.9 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Esta técnica fue utilizada para el análisis de la composición de aminoácidos. Para llevar a cabo la cromatografía en fase reversa es necesario un equipo HPLC cuyas partes principales son:

- 2 bombas peristálticas reguladoras del flujo del eluyente.
- Un contador del gradiente y flujo del eluyente (Waters multisolvent).
- Válvula Rheodyne con un bucle de 20 μ l.
- Detector de fluorescencia (Pye Unicam PU 4024). Las medidas se realizaron a 280 nm de longitud de onda de excitación y a 700 nm de emisión, empleando una lámpara de tungsteno halógena y en combinación con un filtro.
- Columna cromatográfica: Spherisorb ODS-2.
- Procesador de datos (Ordenador con el programa Baseline 810) de la casa Waters.

Reactivos.

- Agua ultrapura, obtenida mediante un equipo Millipore.
- Fosfato sódico de grado analítico.
- Hidróxido sódico.
- Metanol para HPLC (Sharlau)
- Acetonitrilo para HPLC (Sharlau).
- Acido Mercaptopropiónico (Sigma)
- Orto-oftaldehido (OPA)
- Estándar de 18 aminoácidos (Sigma)
- Acido Bórico.

Preparación del agente derivatizante.

Se pesaron 50 mg de OPA al que se le añadieron 4.5 ml de metanol. Una vez disuelto el OPA en el metanol se añadieron 50 μ l de 3-MPA que actúa de reductor en la reacción, por último, se le añadieron 0.5 ml de tampón borato a pH 9.5 y de concentración 1 M. Las condiciones de almacenamiento fueron a 4°C y en oscuridad, manteniéndose estable una semana.

3.2.10 Western blotting

- **Electroforesis inicial, previa a la transferencia:** SDS-PAGE al 12,5%, en una Protean-Biorad, a 20 mA inicialmente y 30 mA cuando el chivato ha atravesado el gel empaquetador ("stacking gel").

- **Tratamiento del gel:**

Se sumerge el gel durante 20 min. en el tampón de transferencia (50 mM Tris, 50 mM glicina, 20 % metanol)

- **Tratamiento de la membrana PVDF ("Immobilon P"):**

Cortar dos membranas del tamaño del gel.

Humedecer de 3 a 5 seg. con metanol 100%.

Lavar con agua, para la extracción del metanol, durante 1-2 min.

Sumergir las membranas en el tampón de transferencia 3 min.

- **Preparación de los filtros:**

Se utilizan 14 trozos de papel Whatman 3 MM del tamaño del gel, y se humedecen en el tampón de transferencia antes de montar el "blot".

-**Montaje del "semi-dry blot":**



- Condiciones de la transferencia:

Conectar durante 2 h a corriente constante. (0.8 mA/cm² de gel)

- Tratamiento después de la transferencia:

Teñir las dos membranas de PVDF durante 10-15 min. con una disolución de ácido acético 10%, metanol 50 %, 0.025 % (p/v) de Azul Coomassie.

Desteñir con acético 10%, metanol 50%.

Lavar brevemente con agua y cortar la banda de interés.

Dejar secar al aire y guardar en un eppendorf.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. RESULTADOS.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LAS FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN *Hf.mediterranei*.

4.1.1 Introducción.

Se observó que los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) en bacterias entéricas son relativamente insensibles a la fuente de carbono usada en el crecimiento celular, pero responden significativamente a las distintas fuentes de nitrógeno. El uso de amonio y glutamina origina en estas bacterias un aumento de los niveles de GDH mientras que el crecimiento con fuentes pobres de nitrógeno (p.ej. γ -aminobutirato) produce niveles de GDH bajos (Bernolhr, R.W. et al., 1984)

Sin embargo, los niveles de actividad de GDH en *Corynebacterium callunae*, tanto la reacción de aminación (NADPH-dependiente) como la de desaminación (NADP⁺-dependiente) no se ven afectadas por el tipo y concentración de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, aunque sí se ven afectados los niveles de actividad del enzima al variar la fuente de carbono, por ejemplo, al utilizar como fuente de carbono piruvato se reducen de dos a tres veces dichos niveles en comparación con las células crecidas con glucosa. Ello implica que en *C.callunae* este enzima es más susceptible de regulación por fuente de carbono que por fuentes de nitrógeno (Ertan, 1992).

En las raíces y cotiledones de *Citrullus vulgaris* se ha observado que el tipo y la concentración de la fuente de nitrógeno controlan los niveles de actividad de GDH (González-Bravo y Maeso, 1986). En *Vitis vinifera* se ha demostrado, que al introducir amonio como fuente de nitrógeno en el medio, se induce la síntesis de isoenzimas de GDH que muestran una actividad anabólica (NAD-dependiente) (Loulakakis et al., 1992).

4.1.2 Metodología (Fuente de Nitrógeno).

- Se realizaron cultivos cambiando la fuente de nitrógeno y su concentración.

- En estos cultivos la glucosa (20 mM) fue la fuente de carbono, que se mantuvo constante en todos. Se utilizaron como fuente de nitrógeno: amonio, nitrato y L-glutamato, suministrados en la forma $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$, KNO_3 y L-glu, respectivamente. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla C1 y Fig. C.1.

- Posteriormente se llevó a cabo un experimento comparando una concentración igual para las tres fuentes de nitrógeno.

Primeramente se inocularon células en un cultivo cuya fuente de nitrógeno era amonio 20 mM; cuando el cultivo todavía estaba en fase exponencial (al final de dicha fase) fue parado y se extrajeron las células, que previo lavado fueron separadas en dos partes, una que siguió el proceso hasta extracto donde se midió la actividad, y la otra se inoculó en un cultivo cuya fuente de nitrógeno era nitrato 20 mM; posteriormente se interrumpió dicho cultivo en la misma fase y se realizó el mismo proceso; las células aquí obtenidas fueron inoculadas en un cultivo cuya fuente de nitrógeno era L-glutamato 20 mM. Esto nos permitió observar qué condiciones eran idóneas en cuanto a la naturaleza de la fuente de nitrógeno, confirmando así el primer experimento.

4.1.3 Resultados y discusión.

Cuando se utilizó amonio como fuente de nitrógeno se observó que la NADP-GDH alcanzaba el máximo de actividad a una concentración del 2 %, manteniéndose a esos niveles en las concentraciones posteriores estudiadas, y aumentando considerablemente a la concentración del 5%.



Tabla C.1.: Actividad específica (U/mgP) obtenida para diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno.	Concentración	NADPH-dep.
NH ₄ ⁺	1 %	0.336
	2 %	0.539
	3 %	0.537
	4 %	0.510
	5 %	0.689
NO ₃ ⁻	1 %	0.180
	2 %	0.246
	3 %	0.207
	4 %	0.068
	5 %	0.093
L-glu	10 mM	0.409
	20 mM	0.486
	30 mM	0.481
	40 mM	0.454
	50 mM	0.463



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

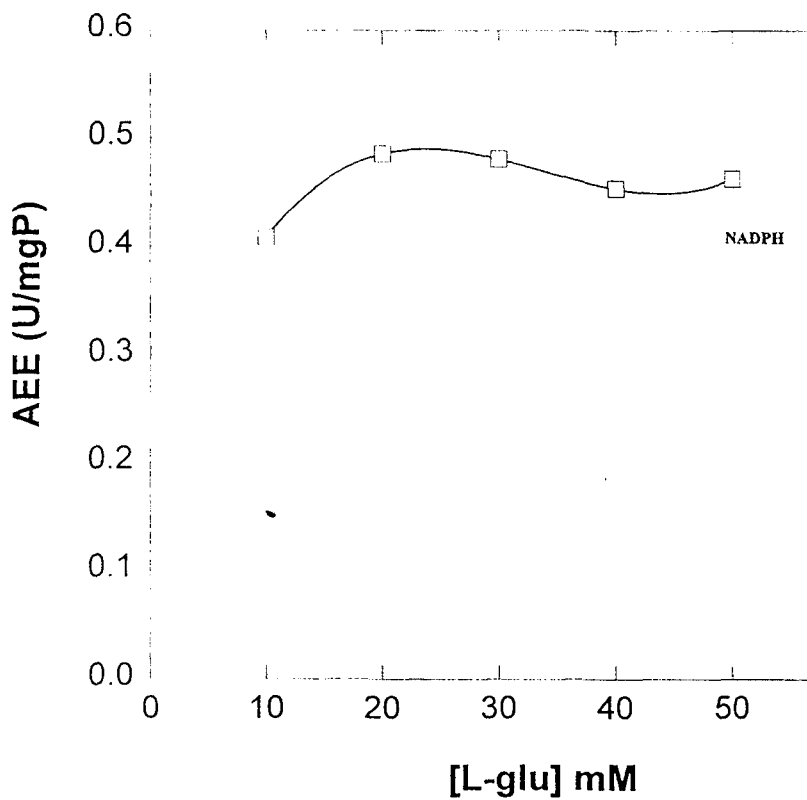
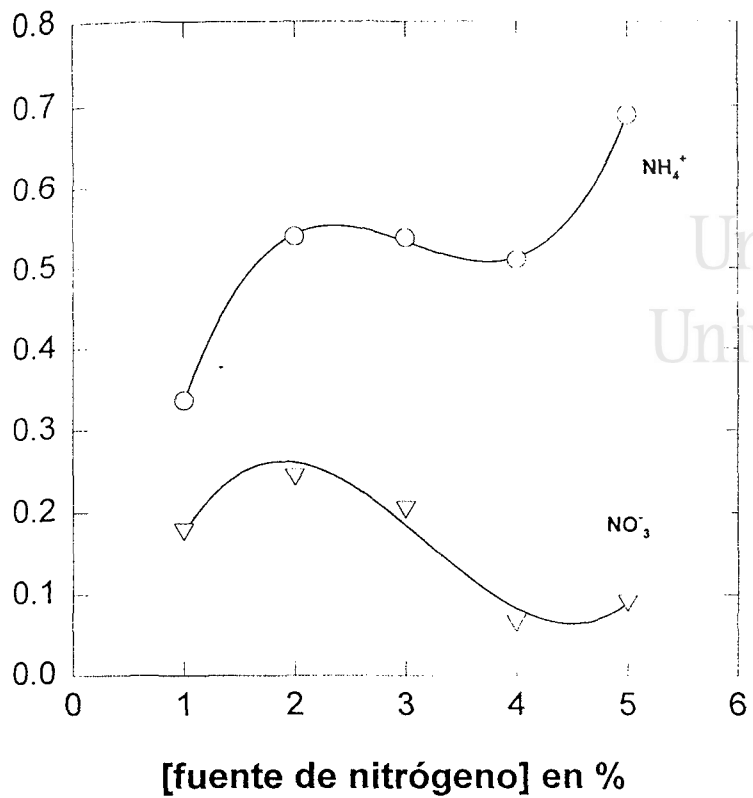


Fig. C.1.:Efecto de las distintas fuentes de nitrógeno sobre la actividad enzimática NADP-GDH.

Sin embargo, cuando la fuente de nitrógeno era nitrato se observó una inhibición parcial de la actividad NADP-dependiente, con niveles de actividad del orden del 50% con respecto a la obtenida a la misma concentración de amonio, que se acentuaba a partir del 4 % situándose dichos niveles del orden de 4 a 5 veces inferiores. Cuando se utilizó como fuente de nitrógeno L-glutamato, se observó que la actividad NADP-dependiente permaneció a unos niveles próximos a los obtenidos en los cultivos de amonio y manteniéndose más o menos constantes independientemente de la concentración.

La segunda experiencia descrita en la metodología fue realizada para comprobar si había o no una activación o inhibición de la síntesis de GDH debido a la fuente de nitrógeno, como anteriormente se ha citado.

Se eligió tomar la concentración 20 mM de NH_4^+ basándonos en los resultados publicados por Bogóñez et al., (1985), donde se describe el efecto de la concentración de amonio en el medio de cultivo sobre la actividad NADP-GDH en *Saccharomyces cerevisiae*. La actividad de dicho enzima se incrementó cuando se elevó la concentración de amonio por encima de 24 mM, alcanzando su máximo a una concentración de 30 mM y decreciendo posteriormente. Asimismo nos apoyamos en la metodología descrita por Rodríguez-Valera (Rodríguez-Valera et al., 1983) sobre el medio de cultivo para *Haloferax mediterranei*. Ahora bien, en los cultivos que se realizaron durante todo este trabajo se utilizó una concentración del 2% de amonio (151 mM), ya que se vio que la actividad del enzima ensayado y el tiempo de crecimiento del cultivo eran mejores.

Los resultados se muestran en la Tabla C.2, y como se puede contemplar cuando se interrumpió el cultivo en la fase exponencial y se inoculó otro cultivo cuya fuente de nitrógeno era nitrato 20 mM se observó una pérdida de actividad del orden de 5 a 6 veces con respecto al cultivo de amonio 20 mM (Tabla C.2), lo que nos confirmaría que aun siendo las mismas células, la utilización de nitrato como fuente única de nitrógeno conlleva una pérdida en la actividad enzimática.

Posteriormente cuando se inocularon células del cultivo de nitrato a uno cuya fuente de nitrógeno era glutámico, se recuperó parte de la actividad NADP-GDH, aunque fue 2 veces menor con respecto al cultivo de amonio 20 mM. Esto podría implicar que funcionara preferentemente la vía de incorporación de amonio GS/GOGAT (glutamina sintetasa y glutamato sintasa) frente a la vía GDH, tal y como ocurre en *Corynebacterium callunae* donde se observó la máxima actividad de estos dos enzimas cuando las células se habían crecido con glutamato a concentraciones 5 mM o superiores (Ertan, 1992).

Tabla C.2.: Efecto de las distintas fuentes de Nitrógeno a una concentración de 20 mM. Con interrupción del cultivo e inoculación posterior.

Cultivo	Proteína (mgP/ml)	AEE (U/mgP)
NH ₄ ⁺	2.93	0.847
NO ₃ ⁻	2.96	0.127
L-glu	3.09	0.365

4.1.4 Metodología (Fuente de Carbono).

Se realizaron ensayos similares a los llevados a cabo en el efecto de la fuente de nitrógeno. En este caso se mantuvo amonio 2% como fuente de nitrógeno y como fuentes de carbono se emplearon glucosa, piruvato y sacarosa en un rango de concentraciones de 10 a 50 mM.

4.1.5 Resultados.

Se observó una disminución de la actividad NAD-GDH y un aumento en la NADP-GDH, al hacer crecer *Neurospora crassa* en sacarosa como fuente de carbono desde concentraciones 0.1 a 2.5 %. Cuando la fuente de carbono fue piruvato no influyó en la actividad NAD-dependiente y aumentó ligeramente la NADP-dependiente (Kapoor y Grover 1970). En *Corynebacterium callunae* cuando se utilizó piruvato como fuente de carbono los niveles de actividad NADP-GDH encontrados fueron 2 a 3 veces menores que los de células crecidas con glucosa como fuente de carbono y en presencia de amonio 10 mM como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la actividad NADP-GDH no se vió afectada cuando las células se hicieron crecer en piruvato como fuente de carbono y a niveles altos de amonio 100 mM. (Ertan, 1992).

De los resultados mostrados en este ensayo (Tabla C.3 y Fig.C.2) se desprende que en *Haloferax mediterranei*, cuando la fuente de carbono es sacarosa, la actividad NADP-dependiente muestra unos valores muy similares a las distintas concentraciones de sacarosa, exceptuando la concentración más alta; sin embargo cuando la fuente de carbono fue piruvato, se observó una menor actividad a la concentración más baja de 10 mM, duplicándose este valor en 20 mM y manteniéndose constante en

TABLA C.3.:Efecto de las distintas fuentes de Carbono sobre la actividad GDH NADP-dependiente.Expresada en U/mgP.

Fuente de Carbono	Concentración(mM)	NADP-depend.
Glucosa	10	0.323
	20	0.408
	30	0.340
	40	0.275
	50	0.192
Piruvato	10	0.196
	20	0.584
	30	0.557
	40	0.501
	50	0.490
Sacarosa	10	0.350
	20	0.340
	30	0.349
	40	0.345
	50	0.273

rango de concentraciones estudiado. La ausencia de diferencias a las distintas concentraciones estudiadas tanto de piruvato como de sacarosa podría deberse a que a niveles altos de amonio no influye la fuente de carbono. Cuando la fuente de carbono fue glucosa se observó por un lado, un aumento en la actividad hasta un máximo que se alcanzó a 20 mM de concentración y por otro lado, una disminución de la misma conforme se aumenta la concentración de glucosa. También es destacable los mayores niveles de actividad que se obtuvieron cuando la fuente de carbono fue piruvato.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

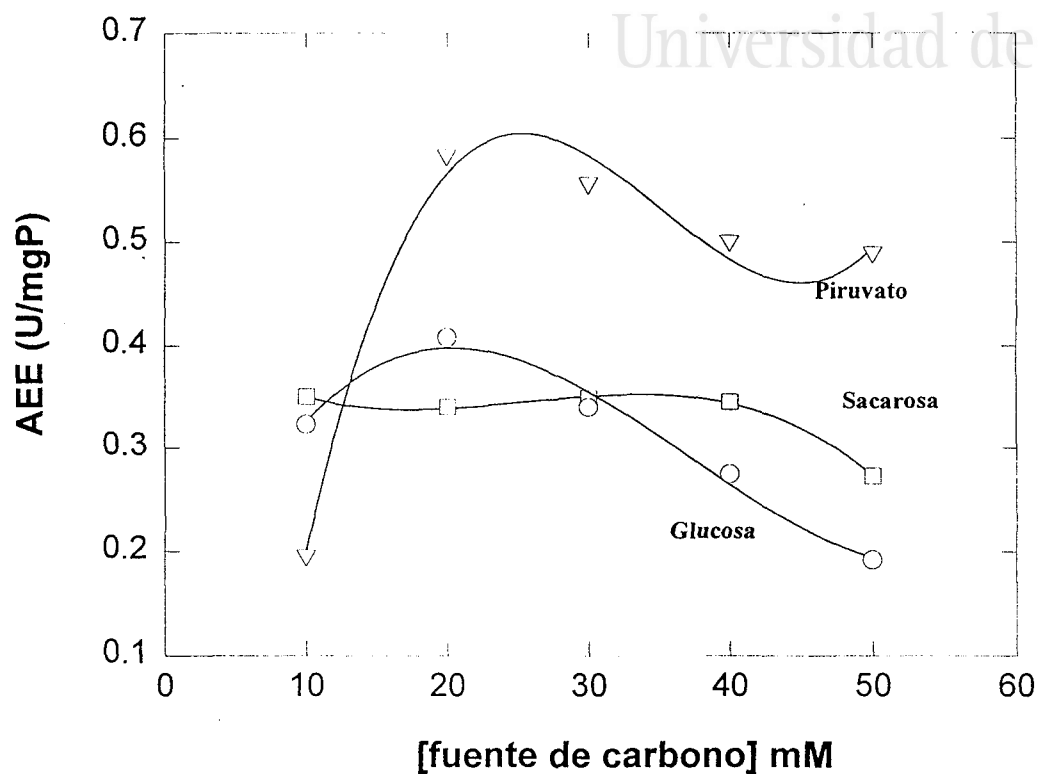


Figura. C.2.: Efecto de la concentración y tipo de la fuente de carbono en la actividad NADP-GDH.



4.2 PURIFICACIÓN DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

4.2.1 Introducción.

Un hecho característico de muchas proteínas de bacterias halofílicas es su inestabilidad a bajas concentraciones de sal (<0.5M) (Leicht et al., 1978). Esto conlleva un problema grave a la hora de purificar dichas proteínas, debido a que la mayoría de las técnicas de purificación se desarrollan bajo condiciones de baja salinidad, lo que origina en las proteínas halofílicas una pérdida de su estructura nativa y de su actividad (en caso de tratarse de enzimas); sin embargo, hay otros enzimas halofílicos como malato deshidrogenasa de *H.salinarium* (Holmes y Halvorson, 1965) e isocitrato deshidrogenasa de *H.cutirubrum* (Hubbard y Miller, 1969) que se pueden purificar en condiciones salinas bajas. Aunque la mayoría de los enzimas halofílicos estudiados se inactivan irreversiblemente en ausencia de concentraciones elevadas de sales neutras, esto hace difícil su purificación y caracterización (Norberg y Van Hofsten, 1970). Algunos enzimas pueden renaturalizarse por un nuevo aumento de la concentración salina (Mevarech y Neumann, 1977).

El efecto de la concentración salina sobre la estructura de la proteína es similar a la estabilización de ésta por glicerol ya que éste formaría un volumen de exclusión alrededor de la proteína (Zaccal y Eisenberg, 1990).

4.2.2 Metodología.

En principio se optó por la metodología utilizada en este laboratorio en la purificación de la glutamato deshidrogenasa NAD⁺-dependiente de *H.halobium* (Bonete et al., 1986).

El extracto bacteriano de *Hf. mediterranei* se obtuvo cosechando las células a partir del cultivo líquido mediante centrifugación a 12.000 rpm. durante 20 min.; se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0.05 M, pH=6.6, conteniendo $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ 2.5 M. Las células se rompieron por sonicación, posteriormente el sonicado fue centrifugado a 105.000 g durante 60 min. a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo enzimático.

El primer paso en la purificación fue una cromatografía en Sepharosa 4B, equilibrada con tampón fosfato sódico 0.05 M, pH=6.6, conteniendo $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ 2.5 M. La cromatografía se desarrolló utilizando un gradiente de concentración decreciente de sulfato amónico desde 2.5 M a 0.5 M, disuelto en el tampón anterior. Como se muestra en la Fig.P1 se detectaron dos actividades GDH, una dependiente de NADP y otra de NAD.

El método de fraccionamiento en Sepharosa con sulfato amónico permite manejar grandes cantidades de proteína además de poseer un buen poder de resolución, por estas razones, suele ser el método de separación elegido como primera etapa en la purificación a partir del extracto crudo.

El método aplicado fue una modificación del utilizado por Mevarech et al. 1976,1977, para separar NADP-glutamato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa de *H.marismortui*., consistente en la eliminación de una etapa de diálisis en la que se perdía actividad.

Las proteínas halofílicas son solubles a la concentración de sulfato amónico de 2.5M, concentración utilizada en esta etapa, observándose que en estas condiciones casi todas las proteínas halofílicas se retienen en Sepharosa (Mevarech et al., 1976). Al realizar el gradiente de sulfato

CROMATOGRAFIA SEPHAROSA 4B GRADIENTE SULFATO AMONICO

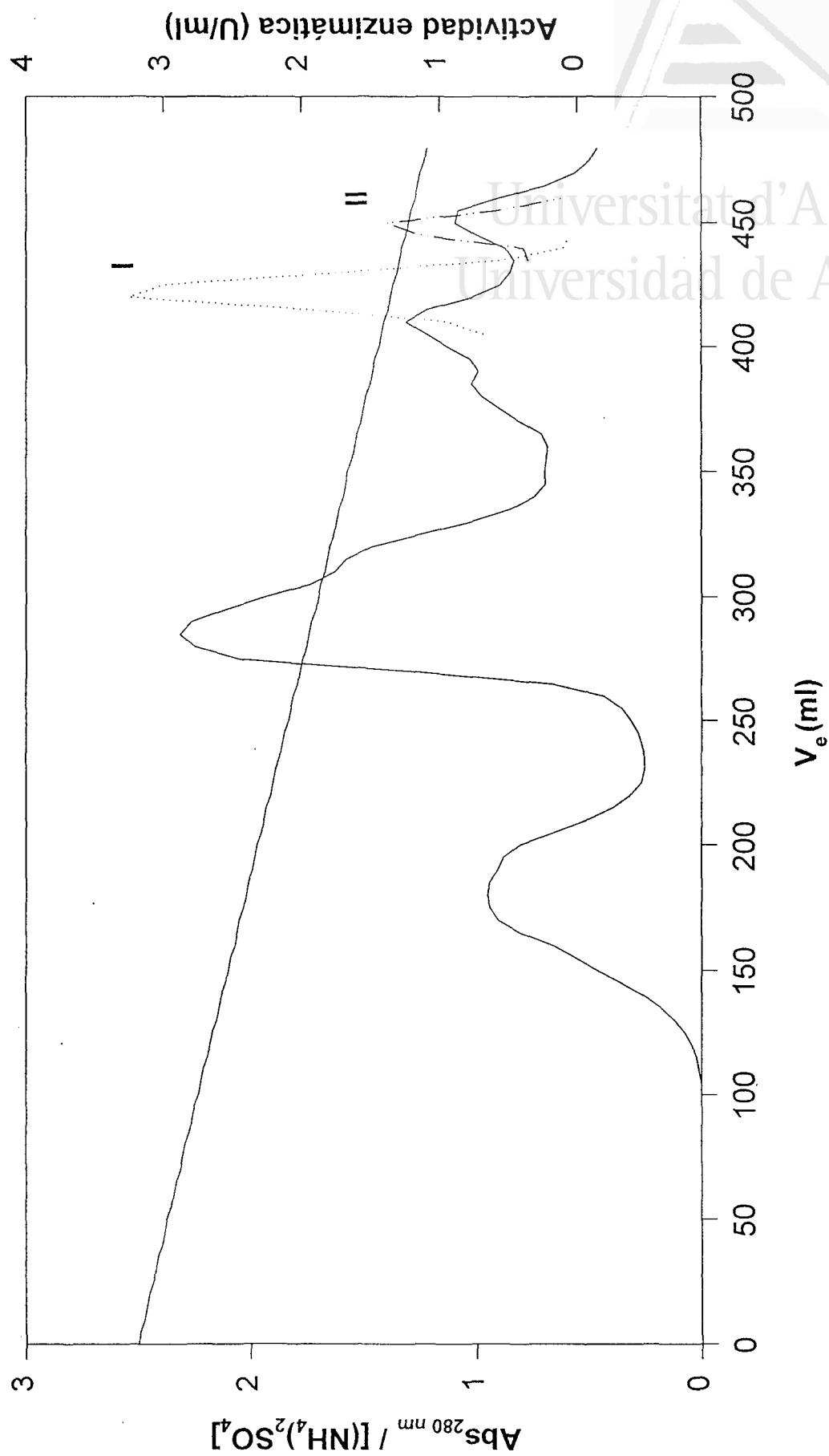


Figura D 1. Cromatograma Sepharosa 4B. Las actividades están representadas por los picos

amónico en concentración decreciente del mismo, se observó que las proteínas más solubles eluyen primero. La actividad NADP-dependiente eluyó a una concentración de 1.38 M de sulfato amónico y la actividad NAD-dependiente eluyó a una concentración 1.31 M. En un principio se pensó que podría ser un enzima que utilizase ambos coenzimas, pues en intentos anteriores, no se obtuvo la separación de los picos de actividad, detectándose dichas actividades en las mismas fracciones.

Se recogieron dos pools diferentes, despreciando el tubo que contenía las dos actividades. La actividad detectada en uno u otro grupo respecto de la otra actividad era mínima. A partir de aquí las siguientes etapas de purificación se desarrollaron independientemente.

La naturaleza de las interacciones entre las proteínas halofílicas y la Sepharosa en presencia de sulfato amónico tienen probablemente naturaleza hidrofóbica debido a que la adsorción de la proteína en la matriz necesita altas concentraciones de aniones sulfato. Este tipo de interacción no ocurre con aniones tales como cloruro (Mevarech et al. 1976).

Purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente.

La muestra obtenida en la etapa anterior con actividad NADP-dependiente, se introdujo en una columna de DEAE-celulosa, equilibrada previamente con tampón fosfato sódico 0.05 M pH=6.6 y sulfato amónico 2.5 M. Posteriormente una vez introducida la muestra se lavó la columna con dicho tampón y se eluyó con tampón fosfato sódico 10 mM pH=7.3 conteniendo 20% Glicerol, 0.5 M NaCl y 2 mM EDTA.

La velocidad de elución fue de 36 ml/hora, recogiendo fracciones de 3 ml. Obteniendo con esta etapa una concentración de la actividad de la muestra (Figura.P.2).

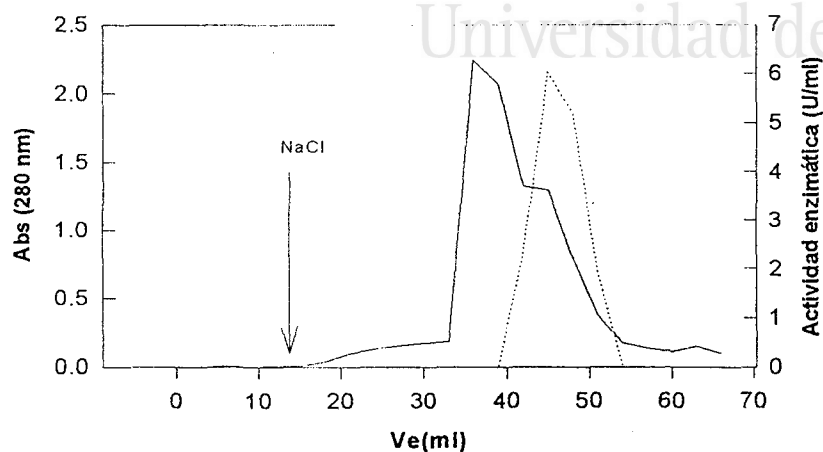


Figura P.2: Cromatografía DEAE-celulosa. NADP-GDH
 Tampón de elución fosfato sódico 10 mM, pH=7.3, conteniendo
 EDTA 2 mM, NaCl 0.5 M y 20 % glicerol.

La siguiente etapa consistió en una cromatografía de adsorción en Hidroxiapatito, la cual se desarrolló con un gradiente discontinuo de fosfato. La columna se equilibró con tampón fosfato sódico 10 mM, pH=7.3, conteniendo EDTA 2 mM, 0.5 M NaCl y 20% glicerol. Se introdujo la muestra y se eluyó con un gradiente continuo de tampón fosfato sódico desde 10 mM a 0.5 M, pH=7.3 y conteniendo 0.5 M NaCl, 20 % glicerol, EDTA 2 mM. La figura P.3 muestra el cromatograma obtenido, observándose que la actividad eluyó a una concentración de 0.2 M de fosfato.

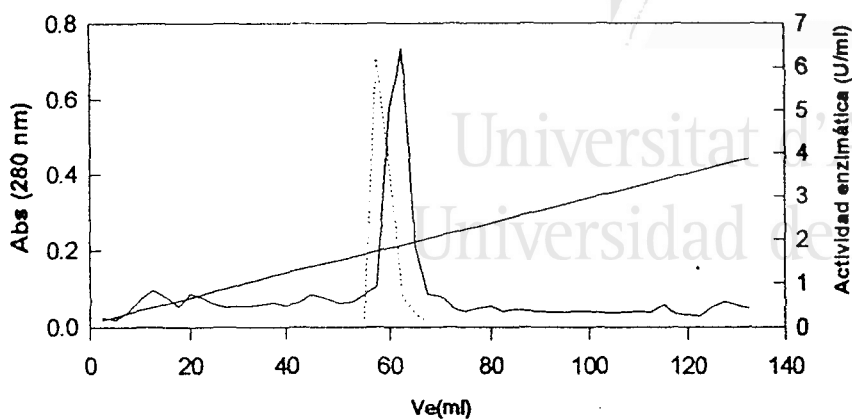


Figura P.3: Cromatografía de adsorción en Hidroxiapatito. Gradiente continuo de fosfato (—), eluyendo el enzima a una concentración entre 0.19 y 0.23 M.

La última etapa consistió en una cromatografía de tamizado molecular en Sepharosa CL-6B. El cromatograma obtenido se muestra en la figura P.4 .

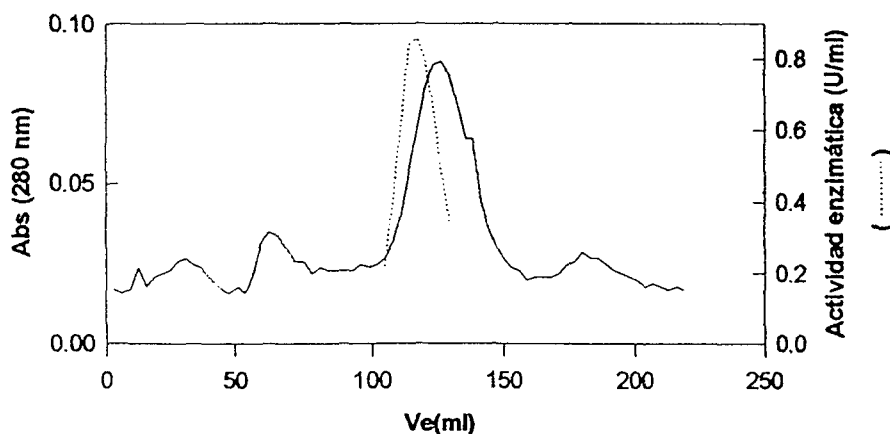


Figura P.4: Cromatografía de tamizado molecular, Sepharosa CL-6B. Tampón de elución fosfato sódico 10 mM, pH=7.3, conteniendo EDTA 2 mM, NaCl 0.5 M y glicerol 20%.

4.2.3 Resultados y Discusión.

Las proteínas halofílicas son solubles a una concentración de sulfato amónico de 2.5 M, concentración utilizada en esta etapa, observándose que en estas condiciones casi todas las proteínas halofílicas se retienen en Sepharosa (Mevarech et al., 1976). Al realizar el gradiente de sulfato amónico (Figura P.1) en concentración decreciente del mismo, se observa que las proteínas más solubles eluyeron primero, siendo el orden de salida, en primer lugar, la actividad NADP-dependiente a una concentración 1.38 M de sulfato amónico y, en segundo lugar, la actividad NAD-dependiente a una concentración 1.31 M. En un principio se pensó que podría ser un enzima que pudiese utilizarse los dos coenzimas, ya que en intentos anteriores no se obtuvo la separación de los picos de actividad, detectándose dichas actividades en las mismas fracciones.

Con la cromatografía en DEAE-celulosa se pretendió conseguir una cromatografía hidrofóbica para las actividades contaminantes, que eluyeran en sulfato amónico y, al mismo tiempo una cromatografía de intercambio iónico para la glutamato deshidrogenasa que eluye con NaCl (Mevarech et al. 1976). Las fuerzas electrostáticas llegan a ser dominantes antes de que las interacciones hidrofóbicas hayan disminuido. De este modo el enzima queda retenido en la columna, ya que se introduce con sulfato amónico, eluyéndose sólo cuando éste es sustituido por una sal tal como NaCl, que aumenta las fuerzas de atracción electrostática sin estimular las interacciones hidrofóbicas (Mevarech et al. 1976). El resultado obtenido, así nos lo confirma, consiguiendo una mayor concentración de la actividad.

En cuanto a la tercera etapa de purificación, cromatografía de adsorción en hidroxiapatito, se utilizó este soporte ya que el hidroxiapatito difiere de un intercambiador iónico en cuanto a que la adsorción de las proteínas pocas veces se ve afectada por la presencia de concentraciones relativamente altas de NaCl (Hjerten, 1959), dado que las proteínas

halofílicas poseen un elevado contenido de grupos ácidos y la adsorción a hidroxiapatito depende de este contenido, se pensó que este método, aplicado anteriormente para la glutamato deshidrogenasa de *H.halobium*, en este mismo laboratorio (Bonete et al. 1986), con excelentes resultados, podría aplicarse a la glutamato deshidrogenasa de *Hf.mediterranei*. El resultado obtenido vino a corroborar lo enunciado anteriormente, lográndose un factor de purificación de 28 para dicha etapa.

En la última etapa, cromatografía de tamizado molecular, se consiguió reducir la cantidad de proteína hasta una concentración de 14 µg/ml, lo que supone un factor de purificación en cuanto a proteína de 230 veces. El factor de purificación obtenido para la actividad enzimática es de 106. Los resultados obtenidos en la purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente se muestran en la tabla P.1.

Tabla P.1:Esquema de purificación para la NADP-GDH de *Hf.mediterranei*

Etapa de Purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (U/mg)	Grado Purific.	Rendimiento (%)
Extracto	49	2.771	0.559	1	100
Sepharosa 4B	25	1.111	1.890	3.4	69
DEAE-celulosa	6	0.866	6.790	12.2	47
Hidroxiapatito	5	0.408	15.660	28	42
Sepharosa CL-6B	6	0.012	59.16	106	6

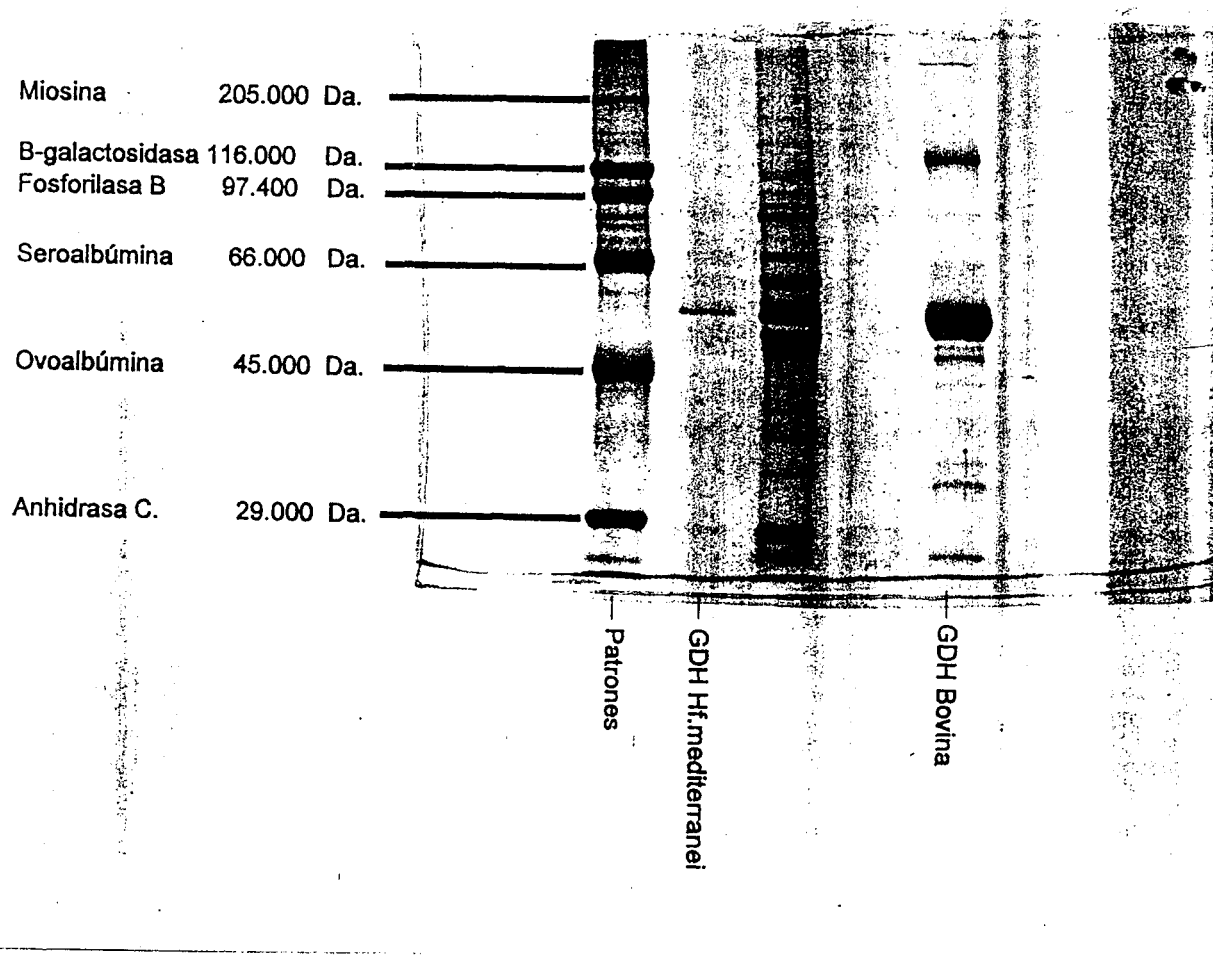
Se realizaron intentos de introducir nuevas etapas en la purificación que la hicieran más rápida y con mejor rendimiento, para ello se utilizaron cromatografías de afinidad (pseudo-afinidad) usando, como ligandos, colorantes textiles ya utilizados en la purificación de distintas proteínas. La especificidad de estos colorantes es debida a que funcionan como inhibidores competitivos para el sustrato, coenzima o efector de una gran variedad de proteínas. Al pasar la proteína por la columna queda retenida en la misma, debido a que se establece una unión entre el colorante y la proteína, posteriormente puede ser eluida generalmente por dos vías:

- 1) Cambiando la fuerza iónica del tampón, normalmente estos enlaces entre ligando-proteína se rompen a una fuerza iónica superior a 0.2 M.
- 2) Por elución selectiva con la introducción en el tampón de un sustrato específico del enzima.

Se probaron dos colorantes: el colorante conocido como Procion-Red, inmovilizado sobre Sepharosa 4B, el cual es específico de proteínas NADP-dependientes, ya que se fija en el sitio de unión de éste en la proteína; y el colorante Cibacron-Blue que presenta una especificidad mayor por las proteínas NAD-dependientes pero también une NADP-dependientes. Tanto en un caso como en otro la proteína fue eluida en el lavado de la columna, por lo que después de infructuosos intentos fue abandonada dicha vía.

4.2.4 Criterio de pureza.

Para determinar el grado de purificación de los enzimas se efectuaron electroforesis analíticas de las distintas fracciones obtenidas a lo largo de los pasos de purificación. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). La Figura P.5, es una fotografía de un gel de electroforesis donde se muestra la última etapa de purificación (Sepharosa CL-6B, teñida con Azul Coomasie) .





4.3 COMPORTAMIENTO HALOFILICO Y TERMOFILICO.

4.3.1 Efecto de las sales en la estabilidad.

4.3.1.1 Introducción.

Los enzimas halofílicos necesitan altas concentraciones salinas, tanto para mantener su estructura como su actividad. En los últimos 30 años se han realizado múltiples estudios para comprender los mecanismos moleculares que adoptan estas proteínas frente al medio en el cual están inmersas.

Las bacterias halofílicas son organismos que crecen en soluciones saturadas de NaCl. La concentración interna de sal en las bacterias del género *Halobacterium* está próxima a 4 M NaCl (Ginzburg et al., 1971). Obviamente la maquinaria bioquímica de estas bacterias, incluidos los enzimas, está adaptada no sólo a altas concentraciones salinas sino también a los cambios en el medio interno del contenido salino (Holmes y Halvorson, 1965). A bajas concentraciones de sal (2 M) muchos de los enzimas halofílicos estudiados se desestabilizan inactivándose (Lanyi 1974).

Kauzmamm en 1959 propuso que los efectos del disolvente en el plegado de las cadenas polipeptídicas para formar una estructura proteica activa desempeñan un papel crucial, argumentando que de estos efectos, las interacciones hidrofóbicas son las más importantes. La estabilización o desestabilización de las estructuras proteicas por disolventes con altas concentraciones salinas probablemente se debe a la modificación de las interacciones hidrofóbicas por la presencia de iones salinos en el disolvente.

Se observó que ciertas sales estabilizan estructuras proteicas y otras las desestabilizan, por ejemplo, iones fosfato y sulfato poseen un carácter "salting-out", comportándose como agentes estabilizadores de la estructura proteica plegada, a altas concentraciones de sal, y a concentraciones mayores, producen agregación y precipitación de proteínas. Por otro lado, litio, magnesio, bromo y tiocianato son iones "salting-in" que rompen agregados proteicos y favorecen el despliegue de proteínas simples. Sodio, potasio y cloro son iones que podríamos decir neutros o ligeramente "salting-out".

Midiendo la hidratación de proteínas y la unión de sales a las mismas en diferentes disolventes, se ha visto que, en condiciones "salting-out", los iones salinos son excluidos de la capa de hidratación que envuelve a la proteína; esto favorece termodinámicamente una mínima superficie entre el disolvente y la proteína, mientras que, en condiciones "salting-in", se producen uniones entre las moléculas de soluto y la proteína, favoreciendo el despliegue (Arakawa et al. 1984).

La estabilización de proteínas halofílicas en disoluciones conteniendo altas concentraciones salinas se ha discutido basándose en peculiaridades de su composición, como es la alta proporción de aminoácidos ácidos en su superficie, comparada con sus proteínas homólogas no halofílicas. Baxter sugirió en 1959 que el efecto de las sales sobre enzimas halofílicas estaba adscrito a interacciones electrostáticas. Esta hipótesis fue posteriormente ampliada implicando específicamente un escudo de cargas negativas sobre la superficie de las proteínas. Esta idea fue apoyada por los análisis de aminoácidos de proteínas halofílicas, que mostraban una presencia de aminoácidos ácidos en exceso. Además Brown en 1964 describió que introduciendo artificialmente grupos cargados negativamente (por succinilación de grupos ϵ -amino de residuos de lisina) se confería propiedades halofílicas a membranas que originalmente no lo eran. Estas hipótesis, a pesar de las evidencias anteriores, resultan insuficientes para

explicar el requerimiento salino de los enzimas halofílicos (Lanyi-et al., 1970). Para ello se introdujeron otros factores como volumen de hidratación e interacciones hidrofóbicas (Lanyi, 1974; Rao et al. 1981). Las cargas negativas en la superficie de las proteínas puede competir con la sal por el agua de hidratación, y la relativamente baja hidrofobicidad de esta composición puede permitir que la proteína se mantenga en disolución a altas concentraciones salinas.

Se han publicado distintos modelos sobre la estabilización de malato deshidrogenasa de *Halobacterium marismortui* (Mevarech et al., 1977; Pundak y Eisenberg 1981; Zaccai et al., 1986; Calmettes et al., 1987) resultando todos ellos incompletos para explicar todos los datos que se han publicado sobre actividad, estabilidad, estructura, interacciones con el solvente, etc.

Zaccai en 1989 propuso que la malato deshidrogenasa de *Halobacterium marismortui* se estabiliza por diferentes mecanismos dependiendo del tipo de sal donde es activo el enzima, por ejemplo, cuando la sal del disolvente es fosfato potásico el modelo de estabilización es predominantemente de tipo "salting-out", sin embargo, cuando la sal es KCl propone un modelo donde la proteína estaría estabilizada por una red de hidratación en forma de estructura cuaternaria, producida por dímeros de proteína, moléculas de agua e iones salinos (Zaccai et al., 1989).

Todos los autores están de acuerdo que el efecto predominante en el plegamiento y estabilización de la estructura proteica son las interacciones de tipo hidrofóbico. Zaccai y Eisenberg (1990) explicaron los efectos del disolvente sobre el plegamiento y solubilidad de las proteínas dominadas por interacciones hidrofóbicas, así, por ejemplo, el agua no es un buen disolvente para los aminoácidos apolares proporcionando un aumento de los efectos hidrofóbicos, los cuales contribuyen al plegamiento de la proteína de tal forma que, dichos aminoácidos, quedan apantallados frente al disolvente.

La importancia del entorno donde está el enzima se está poniendo de relieve por estudios de mutagénesis dirigida en proteínas no halofílicas, se han sustituido aminoácidos de la superficie de las proteínas, observándose que la contribución de las interacciones disolvente-proteína expuesta a la estabilidad de la estructura proteica es mínima, siendo las interacciones hidrofóbicas las dominantes (Matthews, 1993).

4.3.1.2 Resultados.

Se realizaron diversos ensayos para determinar la estabilidad del enzima a concentraciones salinas bajas, 0.5 y 1 M, y en ausencia total de sal. Para ello se puso el enzima en tampón Tris-HCl 20 mM, pH=8.5, conteniendo EDTA 2 mM y la concentración salina correspondiente, y se incubó durante los tiempos ensayados; midiendo posteriormente la actividad enzimática en condiciones óptimas de medida.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura S.1 donde se observa que a concentraciones de 0.5 M de NaCl, el enzima mantiene alrededor del 50 % de actividad después de 47 h. de incubación; cuando la concentración fue 1 M de NaCl, retuvo el 70 % de la actividad a las 50 h., y en ausencia de sal después de 1 h. se registró un valor de actividad del 30 %. Estos resultados demostraron el carácter halofílico del enzima, siendo mayor su estabilidad a mayor concentración de sal; confirmando que los enzimas del género *Haloferax* muestran en condiciones de baja salinidad cierta estabilidad que no presentan otros enzimas halofílicos. Todo ello nos indicó que era insuficiente la estabilidad conseguida en ausencia de sal para utilizar distintas técnicas y obtener un rendimiento adecuado; por lo que se procedió a estudiar el cambio de la sal por glicerol.

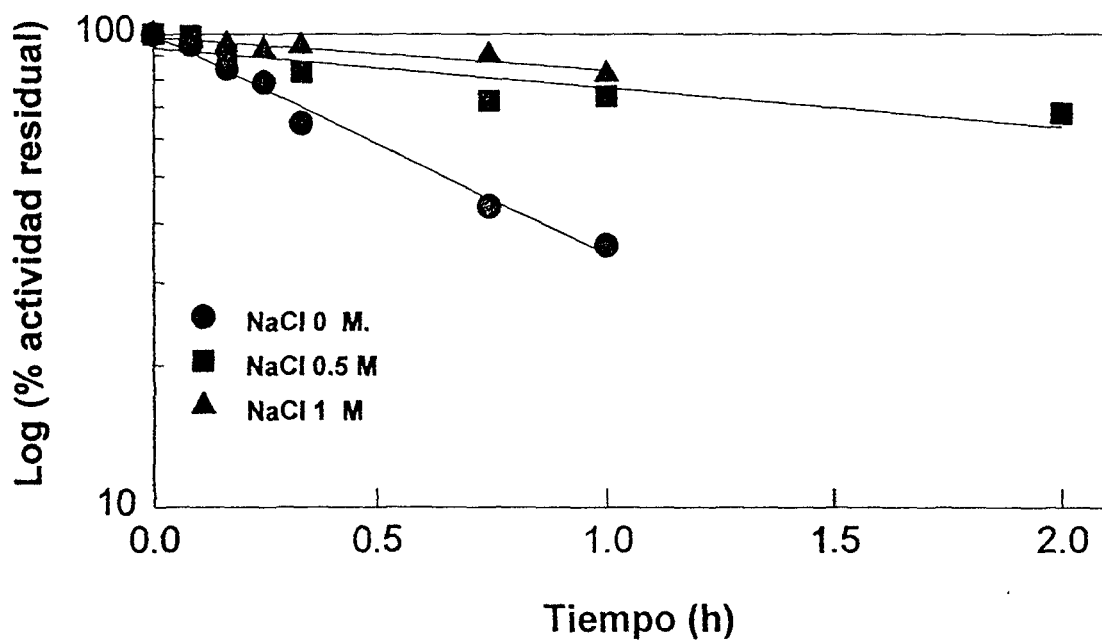
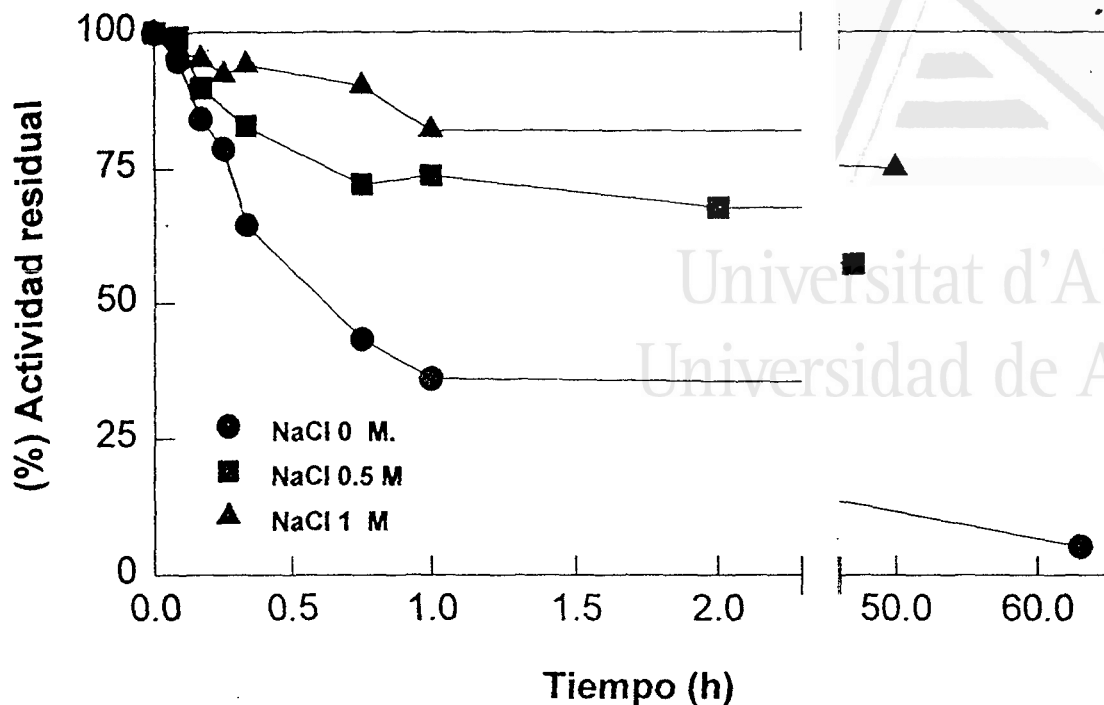


Figura S.1: Cinéticas de estabilidad con la concentración de sal. El enzima se incubó en tampón Tris-HCL 20 mM, pH=8.5, conteniendo EDTA 2 mM y la concentración salina correspondiente en cada caso. La actividad enzimática se determinó en tampón de actividad con NaCl 2 M.

Gekko y Timasheff en (1981) propusieron un mecanismo por el cual se produciría la estabilización de la proteína en presencia de glicerol en los siguientes términos: en medio acuoso el glicerol es excluido preferentemente del dominio de la proteína. Esto significa que la adición de glicerol aumenta el potencial químico de la proteína. Esta situación es termodinámicamente desfavorable. Este efecto es generalizado y no específico y puede ser considerado en una primera aproximación como distribuido homogéneamente sobre toda la interfase proteína-disolvente. Parecía que la reducción de esta interfase llevaba consigo que el sistema fuese menos desfavorable termodinámicamente. La desnaturalización (o desplegamiento) involucraba un aumento entre la superficie de contacto entre la proteína y el disolvente, y en particular, implicaba una exposición de residuos hidrófobos al disolvente. En presencia de glicerol hay un aumento de esta situación termodinámicamente desfavorable, y por tanto, para producir el desplegamiento se requiere el uso de mayor cantidad de energía libre que sólo en agua. Como resultado la presencia de glicerol tiende a favorecer el estado nativo o plegado (Gekko y Timasheff, 1981).

La sustitución de iones salinos por otros compuestos en el disolvente, concretamente glicerol, se ha utilizado por varios autores basándose en que el efecto del glicerol en disolución acuosa sobre la estabilidad de la proteína es similar al efecto observado con iones del tipo "salting-out", dicho efecto sería relativo a la exclusión del glicerol del volumen de hidratación alrededor de la proteína (Zaccai y Eisenberg, 1990).

Se realizó la sustitución de las sales del tampón por glicerol al 20% (v/v) observándose que la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente mantenía su actividad durante un largo período de tiempo (Fig. S.2), lo cual nos permitió realizar distintos estudios sin sales en los tampones que contenían la proteína, así como el empleo de técnicas que no permiten (o su rendimiento disminuye considerablemente) la utilización de disoluciones con alto contenido salino.

Se puede observar en la Figura S.2 cómo al cabo de 7 días de almacenamiento el enzima conservó el 94 % de la actividad, reduciéndose ésta a un 38 % después de 28 días.

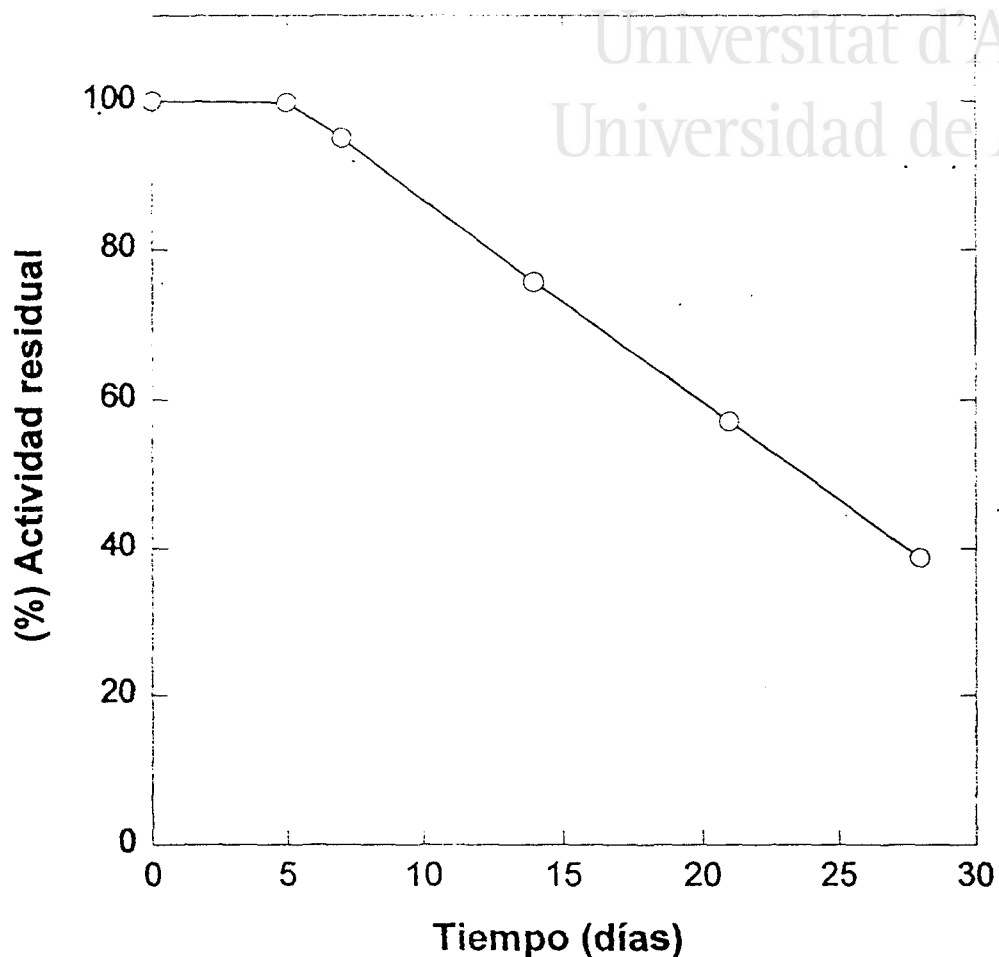


Fig. S.2.: Estabilidad de la NADP-GDH de *Hf. mediterranei* al sustituir las sales por glicerol. La proteína está en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, 2 mM EDTA y 20% glicerol.



4.3.2 Efecto de las sales en la actividad.

4.3.2.1 Introducción.

Los requerimientos salinos de los enzimas aislados de bacterias halófilas extremas han sido ampliamente demostrados (Gibbons, 1957; Larsen 1967; Brown 1964). Todos los enzimas aislados de dichos microorganismos muestran una actividad óptima por encima de una concentración 1 M de NaCl. Se ha sugerido que la concentración salina afecta a la actividad catalítica de manera diferente a como actúa sobre la estabilidad del enzima activo; considerando que un decremento en la concentración salina disminuye la estabilidad estructural (Mevarech y Neumann, 1977).

La mayor parte de los enzimas estudiados muestran curvas semejantes de actividad con KCl y NaCl, principales iones dentro y fuera de la célula respectivamente, mientras que otros presentan mayor actividad frente a KCl que a NaCl. En las glutamato deshidrogenasas de *Halobacterium halobium* el efecto de las sales en las reacciones de aminación y desaminación es diferente, en la aminación el máximo de activación se obtuvo en presencia de NaCl a concentraciones de 3.2 M, y en la reacción de desaminación fue en KCl a 0.4 M. Además, a bajas concentraciones, el efecto estimulador del KCl fue ligeramente superior que el producido por NaCl a las mismas concentraciones. Sin embargo, se obtuvo que a altas concentraciones el KCl tenía un efecto inhibitorio en la reacción de desaminación (Bonete et al. 1986).

Este comportamiento de inhibición y activación dependiendo de la concentración de un ión salino se ha observado en multitud de enzimas, como por ejemplo malato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* resultó parcialmente inhibida por altas concentraciones de NaCl y KCl (Cadenas, 1985); la catalasa de *Halobacterium cutirubrum* mostró el

máximo de estimulación para sales monovalentes a concentraciones desde 0.5 a 1.5 M y para sales divalentes a concentraciones del orden de 0.1 M, por encima de estas concentraciones se observó una inhibición de la actividad enzimática (Lanyi y Stevenson, 1969).

4.3.2.2 Resultados.

En algunos casos la efectividad de la sal sobre la actividad enzimática depende tanto del catión como del anión, en otros casos como la catalasa de *H. cutirubrum* es más importante la influencia de los cationes que la de los aniones (Lanyi y Stevenson, 1969).

En el enzima objeto de nuestro estudio, glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente de *Haloferax mediterranei*, se han estudiado los efectos de las sales en la actividad enzimática usando tanto cationes monovalentes como divalentes así como aniones, el tampón de reacción fue Tris-HCl 20 mM pH=8.5 y EDTA 2 mM al que se le añadieron distintas concentraciones de sal. En la Figura S.3 se muestran los resultados obtenidos representando la actividad relativa del enzima frente a la concentración salina. Como se puede observar el óptimo de sal se situó a una concentración de 2 M para el NaCl, produciéndose a partir de este valor un ligero descenso en la activación. Cuando se utilizó KCl como sal, los resultados obtenidos fueron similares; aunque el óptimo para esta sal se obtuvo a una concentración de 1 M, a concentraciones mayores mostró mayor actividad que cuando la sal fue NaCl a las mismas concentraciones. Lo que estaría más o menos de acuerdo con que el K⁺ es el ión intracelular más importante, de ahí que el enzima alcance su máxima actividad a una concentración menor que cuando el Na⁺ es el catión en el medio.

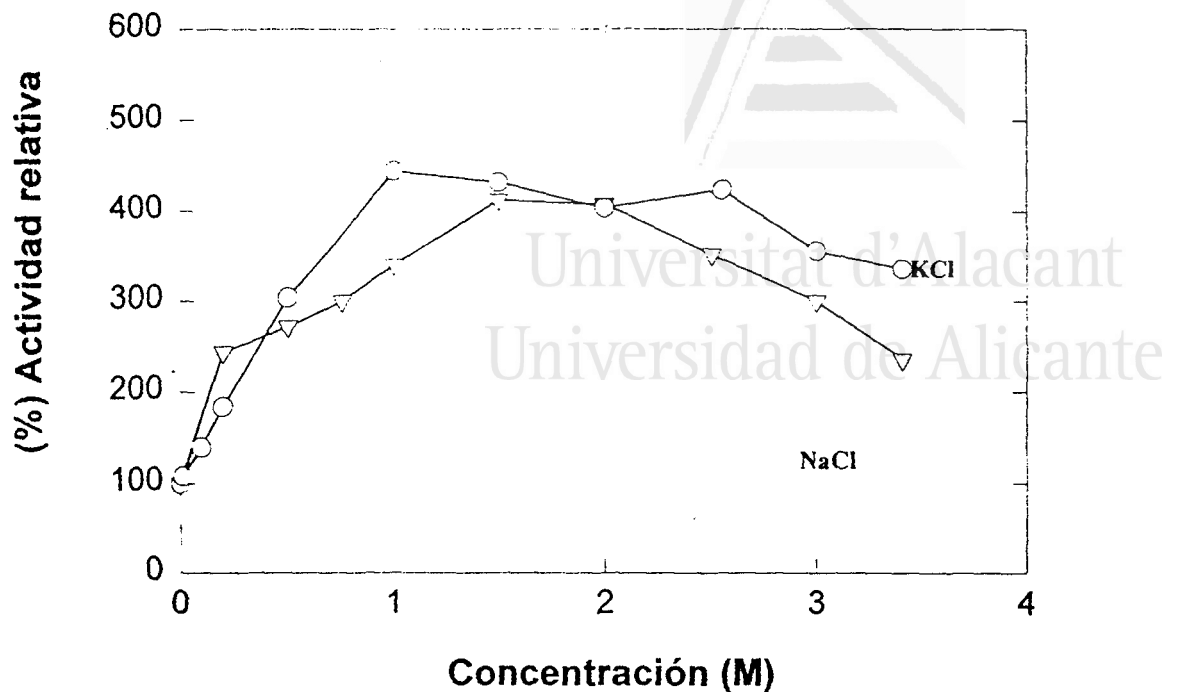


Figura S.3.: Efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad. Dichos valores están referidos a la actividad enzimática en ausencia de sal. El tampón de actividad fue Tris-HCl 20 mM, pH=8.5, EDTA 2mM y la concentración salina adecuada en cada caso.

Para estudiar el efecto de los cationes divalentes se emplearon inicialmente sales tales como $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ en las que no se varió el anión utilizado en el efecto del K^+ y Na^+ . Como se observa en la Figura S.4 la pendiente de la curva de activación producida por Mg^{+2} es muy superior a las pendientes de activación obtenidas con los cationes monovalentes (K^+ y Na^+), y alcanzándose un máximo de actividad a una concentración de 0.2 M, valor bastante más bajo que para los cationes monovalentes. Asimismo se puede observar que hay un efecto inhibitorio por parte del catión divalente cuando se usaron concentraciones superiores a 1 M, inhibiendo totalmente al enzima a 1.7 M. Este efecto del Mg^{+2} se ha observado por diversos autores tanto en enzimas halófilos como no halófilos; en la catalasa de *H.cutirubrum* se alcanzó el máximo de actividad a 0.1 M obteniéndose a concentraciones superiores una inhibición de la actividad enzimática (Lanyi y Stevenson 1969)

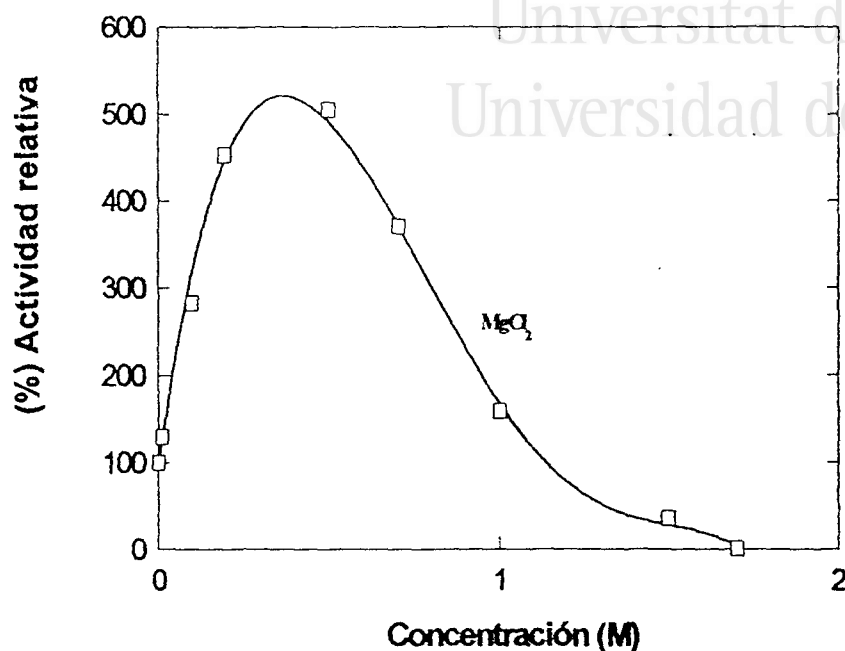


Figura S.4.: Efecto del Mg^{+2} en la actividad de la NADP-GDH. Los valores de actividad están referidos a la actividad en ausencia de sal.

Quando se usó $MnCl_2$ (Figura S.5) se produjo una inhibición de la actividad enzimática conforme aumentó la concentración salina, no observándose un aumento en la actividad para el rango de concentraciones ensayado. Quando se empleó $CaCl_2$ (Figura S.6) se observó que la activación era insignificante, alcanzando su máximo a 10 mM e inhibiendo totalmente la actividad enzimática a una concentración de 0.2 M. Este efecto de inhibición con cationes divalentes, entre ellos los tres citados, se ha descrito en la glutamato deshidrogenasa $NADP^+$ -dependiente de *Methylobacillus flagellatum*, indicando que esta inhibición podría estar relacionada con la posible presencia de grupos sulfhídricos en el centro activo de la glutamato deshidrogenasa (Kiriukihin et al., 1992).

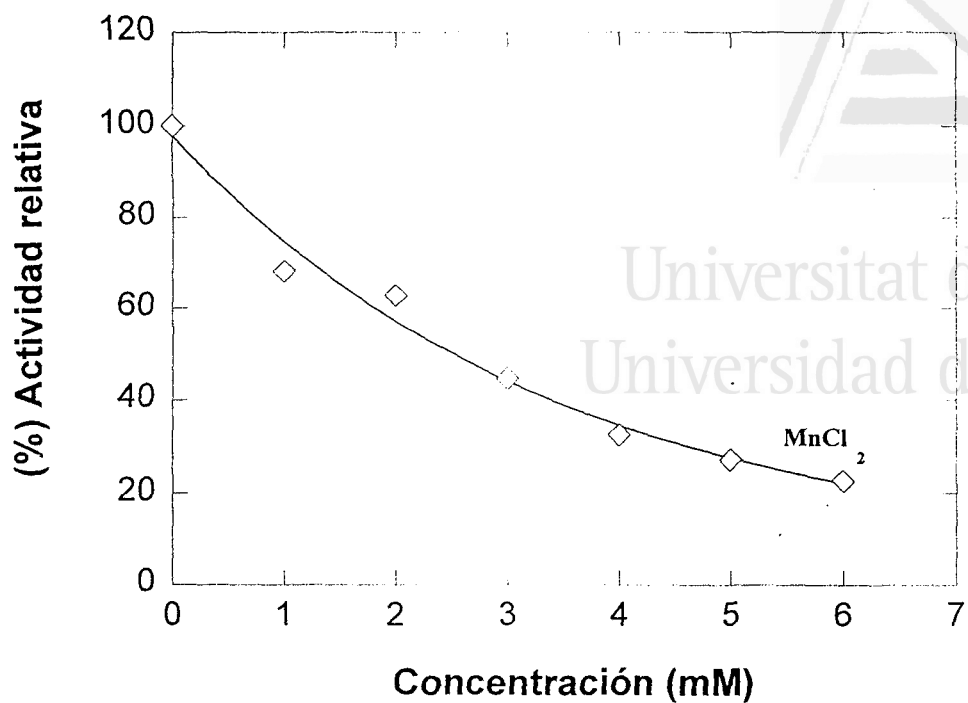


Figura S.5.: Inhibición producida por el cation Mn^{+2} . Los valores de actividad son relativos a la actividad sin sal.

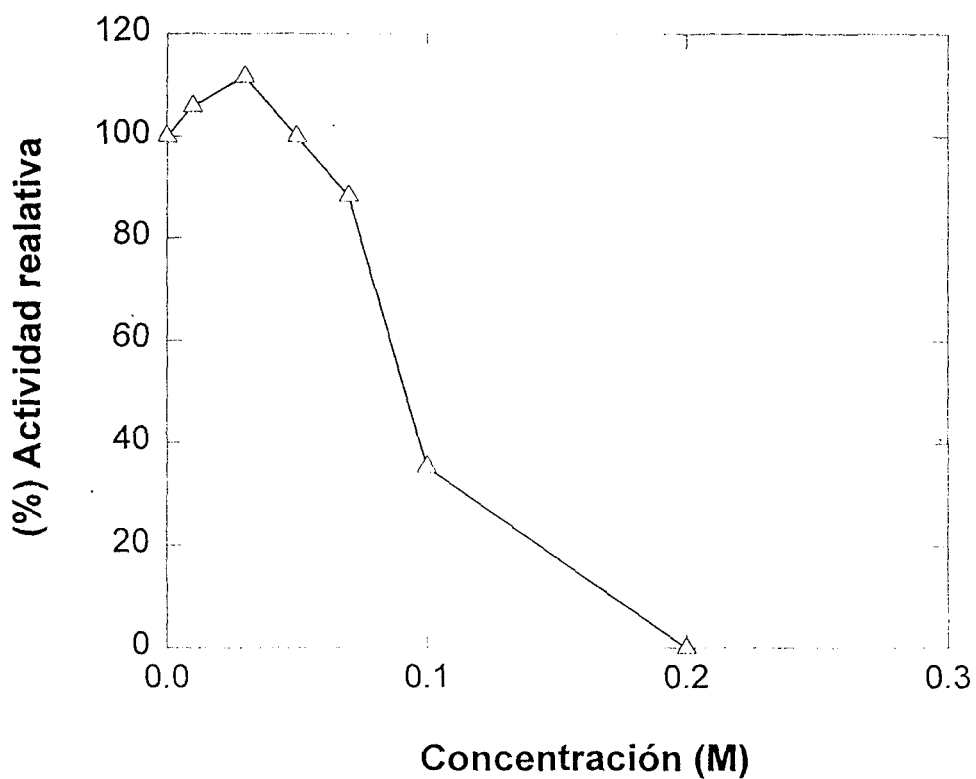


Figura S.6.: Efecto del cation Ca^{+2} en la actividad. La sal empleada fue $CaCl_2$. Los valores de actividad son relativos a la actividad sin sal.

Se han descrito diversas formas de actuación de las sales sobre la actividad catalítica del enzima, entre ellas las más destacables son:

a) La influencia de la sal sobre la actividad del enzima puede ser debida a la unión de agua por las sales, lo que conllevaría cambios en la estructura del agua alrededor del enzima, afectando tanto a la actividad como a la conformación nativa.

b) Las especies actuantes sobre el enzima podrían ser pares iónicos más que iones libres. Aunque no se han detectado pares iónicos en disoluciones diluídas de sales monovalentes, se cree que estas especies están presentes en disoluciones concentradas. Esto se ha propuesto en base a la teoría electrostática, que sostiene que cuando la distancia entre los centros iónicos de cargas opuestas es menor de un valor dado, los iones ya no son independientes sino que deben ser contemplados como pares iónicos. La distancia crítica para iones monovalentes es de 3 a 4 nm, y de 7 a 8 nm para la mezcla de iones tales como $MgCl_2$. Desde consideraciones puramente teóricas, el promedio de distancia entre iones monovalentes salinos en una disolución concentrada (4 M) es de 7 a 8 nm. La activación e inactivación del enzima puede estar relacionada con la afinidad de la misma por pares iónicos específicos más que por cationes o aniones individualmente, cuyos efectos pueden ser independientes unos de otros.

El enzima puede unir simultáneamente cationes y aniones formando una asociación cuya efectividad dependería principalmente de las especies iónicas. Tal interacción es posible si el sitio de unión para los cationes y aniones es cerrado y permite la unión de iones como si fueran pares iónicos.

c) Se han reseñado también en la enolasa de levadura tres sitios específicos de unión para el catión, concretamente Mg^{+2} y Mn^{+2} , el cual juega un papel directo en el proceso catalítico. Estos sitios de unión se han denominado I, II, III, atendiendo a la afinidad del Mn^{+2} por ellos, el I sería un sitio catalítico, el II activador y el sitio III inhibidor, pues se ha visto que a mayor concentración del catión se produce inhibición de la actividad del enzima (Lee y Nowak, 1992).

Se ha descrito en la ATPasa de *Halobacterium saccharovororum*, otro ejemplo de existencia de sitios específicos de unión, este sitio de unión para el metal divalente es distinto del de unión Me-ATP. Esto permite explicar, entre otras cosas, el efecto de la unión de un metal que puede activar o inhibir dependiendo del estado en el ciclo catalítico en el que se encuentre el enzima cuando se una el metal; si la ocupación de este sitio de unión por el metal es después de la hidrólisis completa del ATP causa un bloqueo del enzima (Schobert, 1992).

Es sabido que la unión de ligandos a deshidrogenasas piridín-dependientes y sus cinéticas de reacción están profundamente influenciadas por la presencia de ciertos aniones. La mayoría de los esfuerzos se han dirigido a elucidar el efecto de los aniones sobre la formación del complejo enzima-coenzima reducido, ya que la disociación del complejo se considera la etapa limitante en las deshidrogenasas. Kamlay et al., (1985) explicaron que distintos aniones pueden unirse a la alcohol deshidrogenasa resultando la constante de disociación para el NADH al separarse del complejo enzima-NADH-anión, incrementada de 3 a 4 veces. Este aumento en la constante no es debido a un simple incremento en la fuerza iónica (Kamlay et al., 1985). La reacción de la alcohol deshidrogenasa también es afectada por la presencia de varios aniones. Se ha demostrado que la constante de disociación del complejo enzima-NADH en la lactato deshidrogenasa es incrementada por ciertos aniones, el efecto de los aniones se atribuye a una interferencia entre el

anión y el coenzima en los complejos ternarios, enzima-NADPH-anión (Srinivasan, R., 1991).

El efecto de los aniones sobre la NADP-glutamato deshidrogenasa en la reacción de aminación se ha estudiado por diversos grupos. Pahlich et al. (1978) describieron que la actividad de la glutamato deshidrogenasa de plantas decrece por la presencia de varios aniones, ellos postularon que este efecto se debe a la conversión del enzima desde una forma muy activa a otra de menor actividad por interacción directa con el anión. Blauer y Sund (1977) mostraron que los aniones de las series de Hoffmeister incrementaban la constante de disociación del complejo enzima-NADPH. Sin embargo, con el anión acetato se observó un efecto contrario. Chalabi et al. (1987) descubrieron que la glutamato deshidrogenasa podía unir dos aniones como cuando se unen dos iones fosfato cooperativamente, en consecuencia, hay un incremento de la constante de disociación del complejo enzima-NADPH. En contraste con esto, se observó que el anión acetato disminuyó la constante de disociación en presencia de fosfato, pero produjo un pequeño efecto en ausencia de fosfato. Estos autores explicaron estos resultados postulando que existe una interacción alostérica entre NADPH, acetato y fosfato.

En glutamato deshidrogenasa de hígado de buey (comercial), se encontró que el acetato era un inhibidor competitivo para el α -cetoglutarato, concretamente por algún grupo carboxilo del mismo, compitiendo por una parte del centro activo del enzima (Srinivasan, R., 1991).

En el trabajo que nos ocupa intentamos estudiar el efecto que producen los aniones sobre la actividad enzimática de NADP-GDH de *Hf. mediterranei*, para ello se utilizaron sales de Na_2SO_4 , Na_2AsO_4 y acetato sódico, además del ya estudiado NaCl (Figura S.7). El sulfato sódico fue utilizado hasta 1.0 M, concentración máxima permitida por su solubilidad al pH de la reacción. Para acetato amónico el límite de solubilidad fue de 0.5 M. Al comparar los niveles de actividad de los aniones se observó que



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

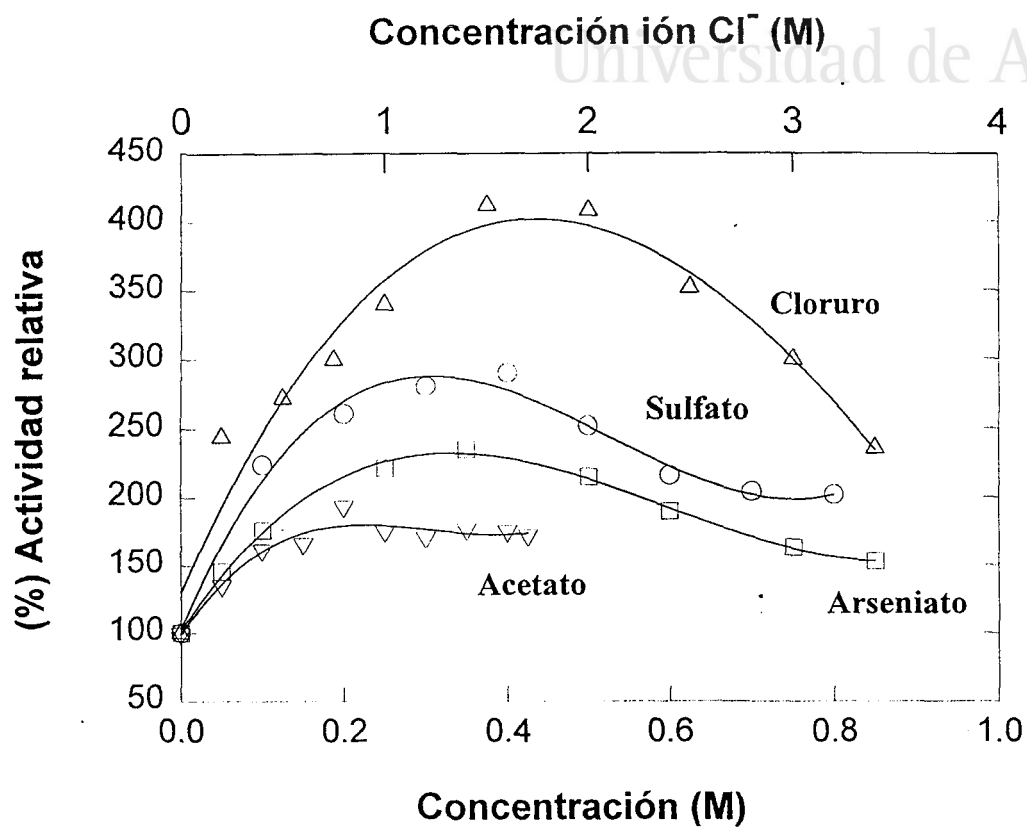


Figura S.7.: Efecto de los distintos aniones sobre la actividad enzimática. Los valores de actividad están referidos a la actividad en ausencia de sal.

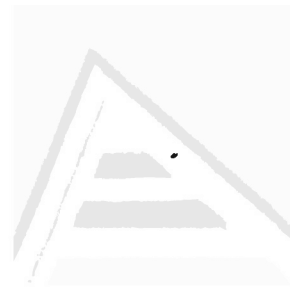
cuando el anión es sulfato, los niveles de actividad son comparables hasta una concentración de 0.4 M a los obtenidos cuando el anión es Cl⁻, experimentando posteriormente una disminución de la actividad. Esto podría indicar que el anión cloruro y el sulfato podrían ser intercambiables hasta una concentración de 0.4 M.

Otro parámetro muy estudiado es la fuerza iónica, ésta puede influir en el mantenimiento de las interacciones electrostáticas entre las subunidades. Por ejemplo, en el caso de la ribonucleasa, incrementos en la fuerza iónica reducen las interacciones electrostáticas y también influye en las propiedades de la unión de los aniones a la proteína.

En piruvato deshidrogenasa de corteza de riñón de cerdo, la actividad de este enzima es sensible a los cambios en la fuerza iónica. A baja fuerza iónica se observó el máximo de actividad; conforme se fue aumentando dicha fuerza iónica disminuyó la actividad, estando el óptimo en un pequeño rango de fuerza iónica entre (0.035-0.040) (Pawelczyk et al., 1992).

Otro ejemplo de relación entre fuerza iónica y actividad enzimática se ve ilustrado en la proteasa del virus HIV-1, donde se observó que la actividad enzimática óptima se encuentra a una fuerza iónica elevada, ocurriendo esta optimización por disminución de la constante de Michaelis-Menten, no viéndose afectada la constante catalítica (K_{cat}) (Wondrak et al., 1991).

Al representar la actividad relativa de los distintos iones frente a la fuerza iónica debida a los mismos (Figura S.8) se observó que el máximo de actividad para cada uno de los aniones se obtuvo en un rango estrecho de fuerza iónica, de 0.6 a 0.8, excepto con el anión acetato donde se obtuvieron los valores más pequeños de actividad que permanecieron más o menos constantes a partir de una concentración determinada (0.15 M),



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

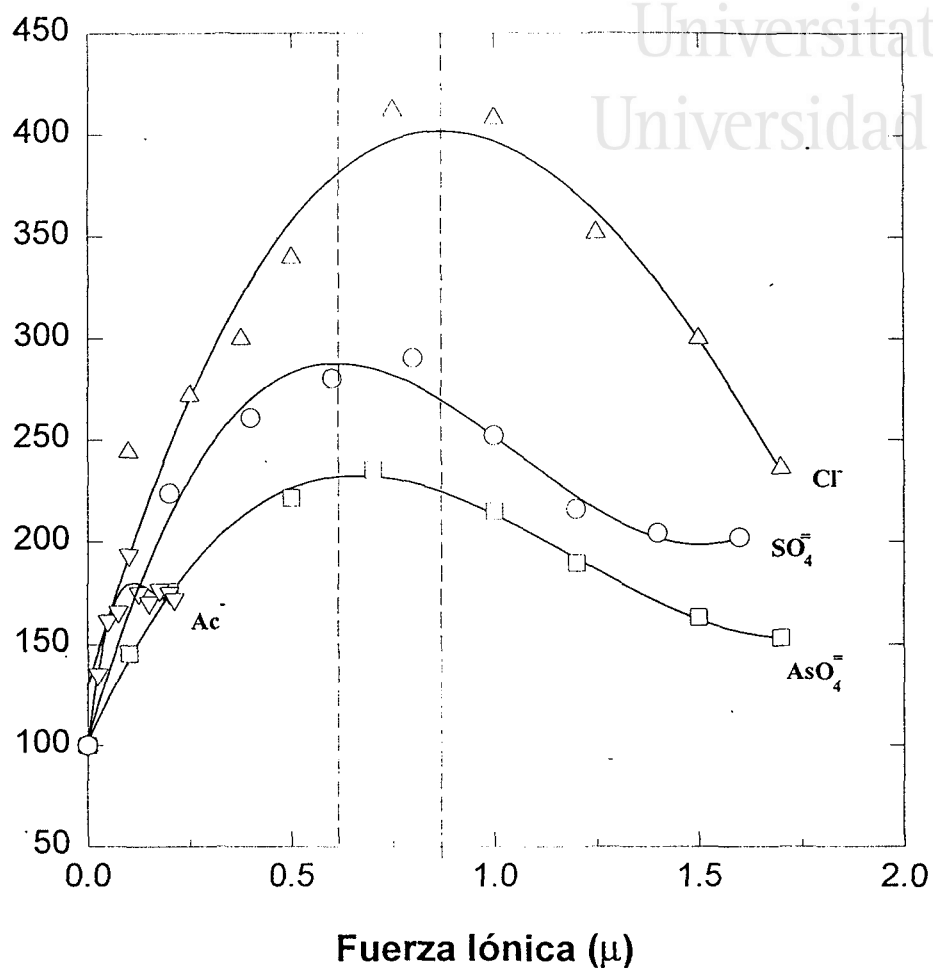
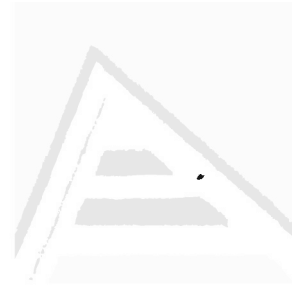


Figura S.8: Representación de Fuerza Iónica frente Actividad enzimática relativa a la actividad en ausencia de sal. Tampón Tris-HCl 20 mM, pH=8.5, EDTA 2 mM, al que se le adicionan las distintas sales.

no observándose una inhibición de la actividad en el rango de concentraciones ensayadas.

Se estudió el efecto del glicerol en la actividad NADP-GDH, sustituyendo las sales por distintas concentraciones de glicerol en el tampón de actividad (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, 2 mM de EDTA). Como se muestra en la Figura S.9 se obtuvo un efecto de inhibición similar al obtenido por el Mn^{+2} . Al contrastar los datos obtenidos para glicerol frente a estabilidad, se puede observar que éste puede sustituir a las sales en su papel estabilizador más o menos eficientemente, pero no es así para la actividad enzimática. Es decir, no podemos sustituir las sales por glicerol en los tampones de actividad.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

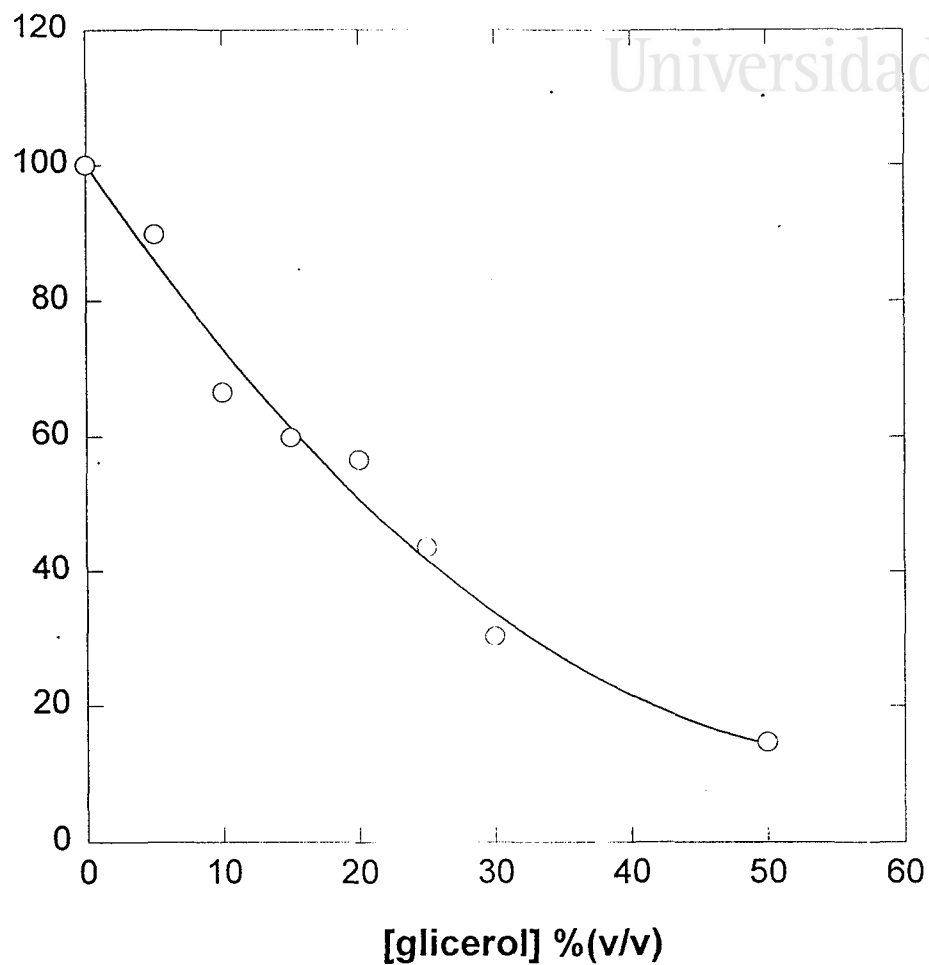
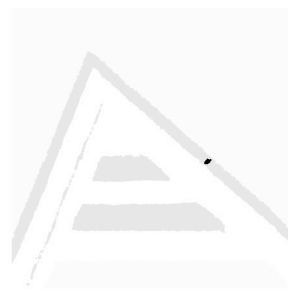


Figura S.9.: Efecto del glicerol sobre la actividad del enzima NADP-GDH. La actividad está referida a la actividad en ausencia de sal. La muestra utilizada fue enzima purificado. Tampón Tris-HCl 20 mM, pH=8.5, EDTA 2 mM, adicionándole la [glicerol].



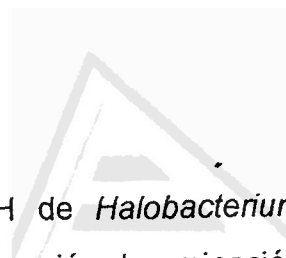
4.3.3 ESTUDIOS DE TEMPERATURA.

4.3.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

La mayoría de las reacciones químicas aumentan su velocidad con la temperatura, de tal forma que un aumento en la temperatura se transcribe en un aumento en la energía cinética de las moléculas reactantes, resultando un incremento del número de colisiones eficaces por unidad de tiempo. Los enzimas catalizan reacciones que siguen este principio hasta cierto punto, no se puede olvidar que la actividad catalítica de los mismos viene dada por la estructura terciaria de éstos, principalmente mantenida por un gran número de enlaces no covalentes; por tanto, si la molécula absorbe mucha energía la estructura terciaria se rompe y el enzima se desnaturaliza, lo que conlleva una pérdida de actividad catalítica.

Al aumentar la temperatura el incremento de velocidad esperado, debido a un aumento de las colisiones entre E y S, es compensado por un incremento en el factor de desnaturalización. Consecuentemente, al representar v frente a T , normalmente se presenta un máximo, al que usualmente se le denomina "temperatura óptima". El verdadero concepto de temperatura óptima para un ensayo es: la máxima temperatura a la que el enzima muestra una actividad constante sobre un período de tiempo al menos igual al tiempo de ensayo (Segel, 1975).

Para establecer la temperatura óptima se preincubó el enzima a un tiempo igual al tiempo de ensayo y se midió la actividad a una temperatura que no causara desnaturalización. Los resultados obtenidos para la glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) de *Haloferax mediterranei* se muestran en la Figura T.1 (V_{app} vs T). Se puede observar que la temperatura óptima se sitúa alrededor de los 60°C, siendo un valor más



bajo que el descrito para el enzima NADP-GDH de *Halobacterium halobium*, que presentó un óptimo a 70°C para la reacción de aminación (Bonete et al., 1987).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

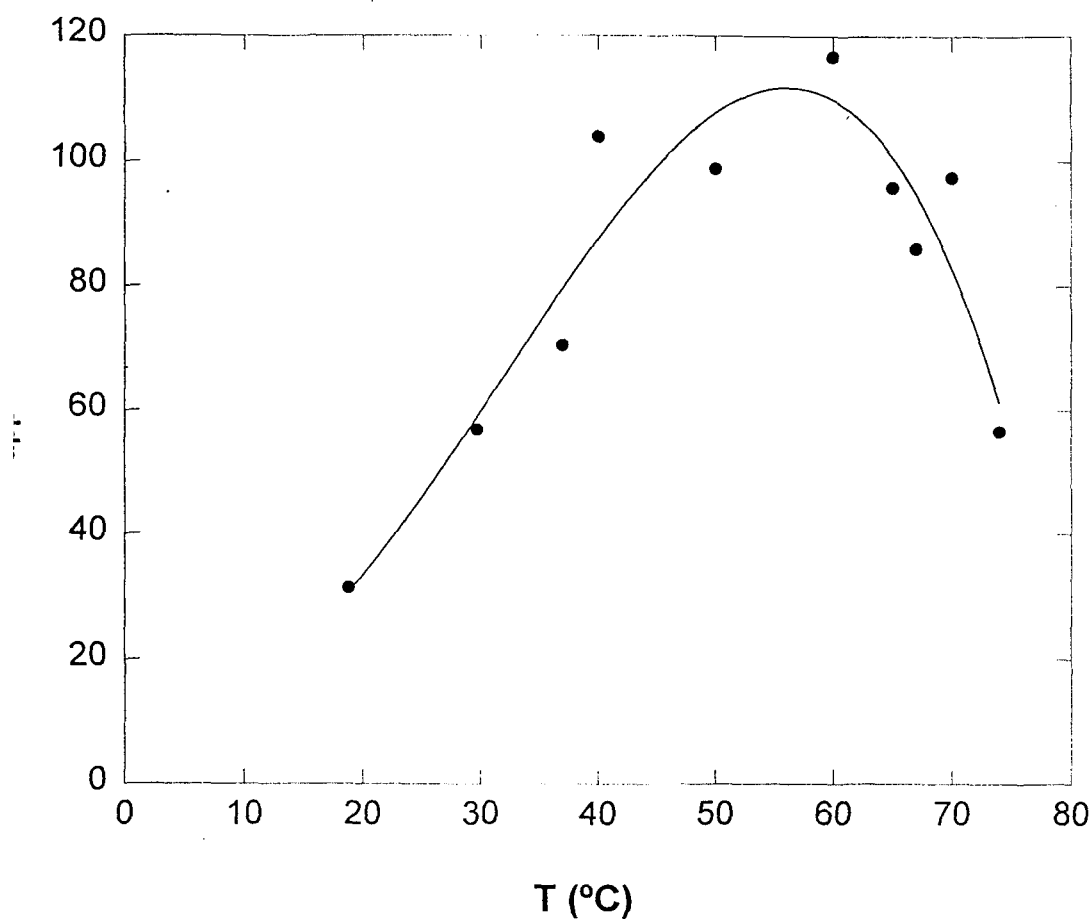


Figura T.1.: Temperatura óptima. Enzima purificado en tampón fosfato 10 mM pH 7.3 0.5 M NaCl y 20 % glicerol. V_{app} esta expresada en % de actividad residual, tomando como 100% la actividad medida a 40°C.

Como ya se ha citado anteriormente la velocidad de la mayoría de las reacciones químicas depende de la frecuencia y efectividad de las colisiones entre las moléculas reactantes, sólo una pequeña proporción de estas colisiones son eficaces, es decir, poseen suficiente energía para promover la reacción. A esta energía mínima se le denomina energía de activación (E_a).

La ley de Maxwell-Boltzman indica que la fracción de moléculas de un sistema que posee al menos una energía igual a la energía de activación a una determinada temperatura, T, es proporcional al término $e^{-E_a/RT}$.

$$\text{Frecuencia de colisión eficaz} = v = \text{cte}[E][S]e^{-E_a/RT}$$

$$\text{Como: } v = k[E][S] \quad \text{donde } k = PZe^{-E_a/RT}$$

siendo P la probabilidad de que haya reacción cuando se produce colisión entre moléculas reaccionantes y Z la frecuencia de colisión.

Más usualmente k se expresa:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (2)$$

Expresión conocida como ecuación de Arrhenius, formulada empíricamente por éste en 1889.

En forma lineal:

$$\log k = -\frac{E_a}{2.3R} \frac{1}{T} + \log A \quad (3)$$

Representando Log k frente a $1/T$ se obtendrá la E_a de la reacción a partir de la pendiente. En la práctica se suele representar Log V_{\max} frente $1/T$, ya que V_{\max} es directamente proporcional a la constante de velocidad de la reacción o constante catalítica.:

La representación de $\text{Log } V_{\text{máx}}$ frente $1/T$ (Figura T.2) para la NADP-GDH halofílica fue lineal, y a partir de la pendiente de la recta se calculó la E_{aapp} . Las concentraciones de los sustratos en la cubeta de reacción fueron NADPH 0.15 mM, 2-oxoglutarato 20 mM y amonio 300 mM. El tampón utilizado fue Tris-HCl 20 mM de pH 8.5 conteniendo NaCl 2 M y EDTA 2 mM. Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un sistema de termostatación conectado al espectrofotómetro.

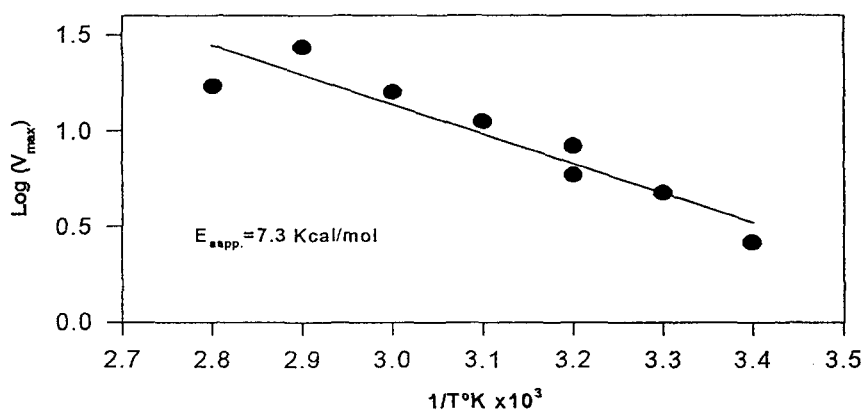
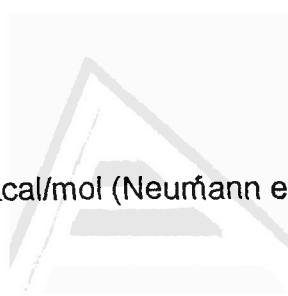


Figura T.2: Representación de $\text{Log}(V_{\text{máx}})$ frente $1/T$. El rango de temperaturas utilizado fue de 18 a 78°C.

La E_{aapp} calculada para la biosíntesis de glutamato fue de 7.32 Kcal/mol (30.6 KJ/mol). Este valor se encuentra dentro del rango normal para la E_a en la catálisis enzimática, que oscila entre 5 y 15 Kcal/mol. Por ejemplo: en *Halobacterium halobium* en el caso de la NAD-GDH (reacción de aminación) la energía de activación obtenida fue de 5.65 Kcal/mol (Bonete et al., 1986). En *Pyrococcus furiosus*, una archaea termófila, la energía de activación encontrada para la glutamato deshidrogenasa, en el sentido de biosíntesis de glutamato, es de 52.3 KJ/mol ó 12.6 Kcal/mol



(Consalvi et al., 1991). En *Candida utilis* es de 14.5 Kcal/mol (Neurmann et al., 1976).

4.3.3.2 Cinética de la Inactivación térmica del enzima.

El efecto de la temperatura en el grado de desnaturalización puede ser descrito por los valores termodinámicos usuales. En general, la E_a para el proceso de desnaturalización oscila en un rango de 50,000 a 150,000 cal/mol y la entalpía del proceso oscila entre 40,000 y 200,000 cal/mol (Segel, 1975).

Si comparamos esta $E_{adesn.}$ con la E_{acatal} (energía de activación de la catálisis), se desprende que a bajas temperaturas la velocidad de desnaturalización es muy pequeña (despreciable) con respecto a la velocidad catalítica; pero conforme se incrementa la temperatura el aumento de la velocidad de desnaturalización es mucho más rápido que el de la velocidad catalítica.

La energía de activación del proceso de desnaturalización ($E_{adesn.}$) y la entalpía del proceso ($\Delta H^{\ddagger}_{desn.}$) pueden ser determinadas a partir de las representaciones de $\log k_{desn.}$ frente a $1/T$ y de $\log (k_{desn.}/T)$ frente $1/T$, respectivamente. Los valores de $k_{desn.}$ se obtienen de las pendientes de las rectas encontradas al representar el log (% actividad residual) frente al tiempo (Segel, 1975) (Lepock et al., 1990).

Al realizar las cinéticas de inactivación del enzima a distintas temperaturas se observó (Figura.: T.3) que a 40 y 50 °C la actividad del enzima permaneció constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, a partir de los 60°C comenzó a decrecer y a los 74 °C se inactivó en pocos minutos (10 min.); mostrando una estabilidad al calor semejante a la descrita para glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH), la cual es completamente inactiva a 75°C. (Bonete et al., 1986).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

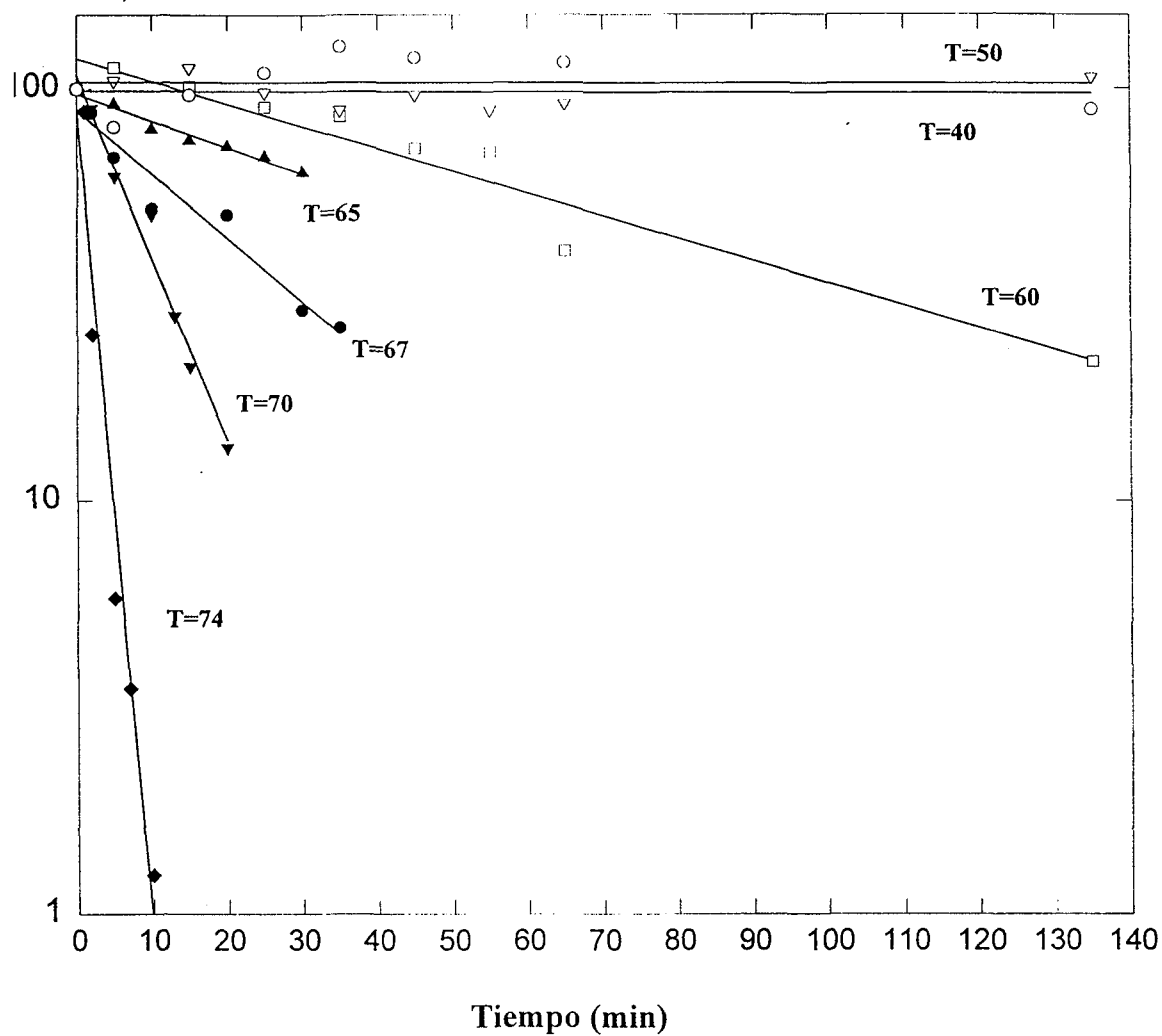


Fig. T.3: Representación de Log (% act. residual) frente a tiempo. El enzima está en tampón fosfato 20 mM pH 7.3, glicerol 20 %, 0.5 M NaCl y 2 mM EDTA.

El valor encontrado para la E_{adesn} fue de 56,358 cal/mol^o (235.6 KJ/mol) y de 55,716 cal/mol (232.9 KJ/mol) para la $\Delta H_{desn}^{\ddagger}$ obtenidos a partir de las pendientes de las rectas de las representaciones de $\log k_{desn}$ vs $1/T$ (Figura.: T.4) y de $\log (k_{desn}/T)$ vs $1/T$ (Figura.: T.5). Estos valores se determinaron a una concentración de 2 M NaCl y se encuentran dentro del rango descrito en la bibliografía, siendo muy semejantes a los mostrados por otros enzimas, por ejemplo, en glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium* del Mar Muerto, la energía de activación que acompaña al proceso de inactivación en el rango de 65-75 °C es del orden de 65 Kcal/mol (Leicht, W. et al., 1978). La aspartato aminotransferasa de *Haloferax mediterranei* en forma de holoenzima presentó una temperatura de desnaturalización de 78.5°C a una concentración salina de 3.3 M de KCl, y el valor de la entalpía del proceso fue estimado en 66.7 Kcal/mol; mientras que la forma apo-transaminasa halofílica mostró una temperatura de desnaturalización de 68.0°C a 3.3 M KCl y un valor de entalpía para el proceso de 43.49 Kcal/mol (Muriana et al., 1991).

La termoestabilidad de proteínas ha planteado distintas cuestiones a las que a lo largo del tiempo se les han dado diferentes respuestas. Algunos autores sugirieron una correlación entre el contenido de aminoácidos hidrofóbicos y la termoestabilidad (Bull y Breese, 1973; Ikai, 1980; Merkler et al., 1981). Argos et al. (1979) reconocieron que la estabilidad térmica de las proteínas viene dada por la adición de pequeños cambios en la molécula proteica, que implican un cambio en la conformación del esqueleto. Recientemente Menéndez-Arias y Argos (1989) por comparación de las secuencias aminoacídicas de proteínas termófilas y mesofílicas, encontraron una disminución en la flexibilidad y un aumento en la hidrofobicidad en las regiones α -hélices como hechos principales en la estabilización. Lo cual está de acuerdo con lo obtenido por Ragone et al. (1992) en un estudio de estabilidad estructural y desnaturalización sobre propilamina transferasa de *Sulfolobus solfataricus*, donde al analizar los datos de dicroísmo circular y termodinámicos se observó que el cambio en



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

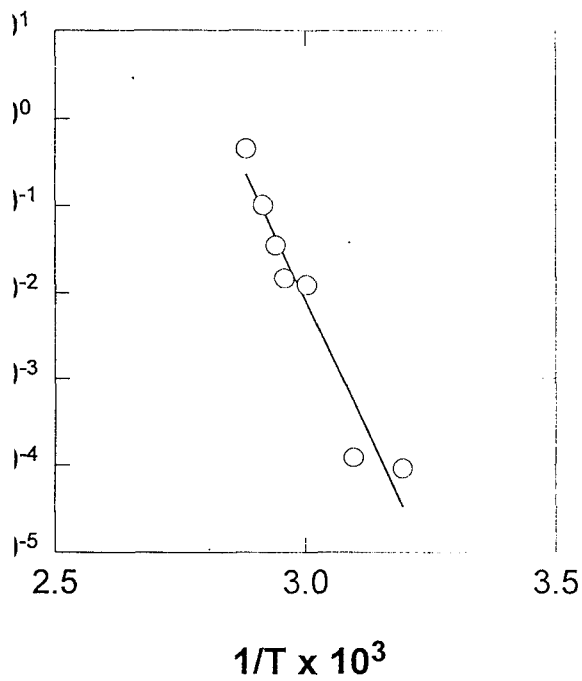


Fig.T.4: Representación del log de las pendientes (K_{desn}) de las cinéticas de inactivación obtenidas en la Fig.T.3 frente a $1/T$.

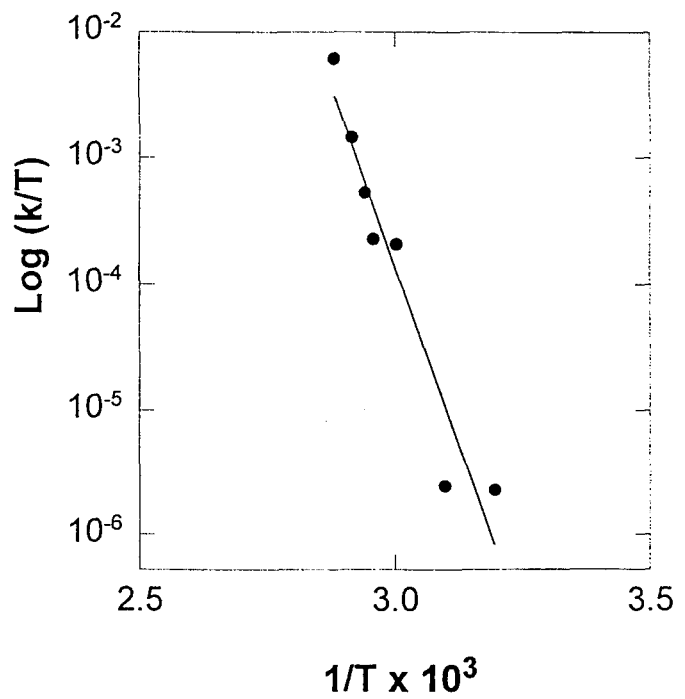
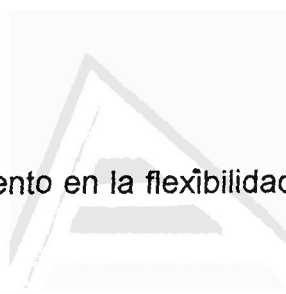


Fig.T.5: Representación del Log (K_{desn}) frente $1/T$.



la estabilidad de la proteína viene dado por un aumento en la flexibilidad de la misma.

Zaccai et al., (1990) propusieron que en la estabilización de proteínas halofílicas interviene la naturaleza del ión salino de la disolución, por ejemplo, las interacciones de iones Na^+ con el agua son significativamente más fuertes que las de los iones K^+ y, por tanto, una estructura estabilizada con éstos es de esperar que posea una energía de activación del proceso de desnaturalización mayor. Sugieren que la E_{adesn} está dominada por términos entálpicos (destrucción de enlaces), lo que podría ser aplicable en nuestro caso ya que la E_{adesn} y la $\Delta H_{\text{desn}}^\ddagger$ son muy similares.



4.4 MECANISMO CINÉTICO.

4.4.1 Introducción.

El estudio de los mecanismos cinéticos es uno de los problemas fundamentales de la enzimología. Toda reacción catalizada por un enzima ocurre a través de la formación de un complejo activo formado entre el sustrato y el enzima (Dixon y Webb, 1979).

Los distintos mecanismos cinéticos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

(i) **mecanismos secuenciales**: en los que todos los sustratos deben combinarse con el enzima antes de que la reacción pueda tener lugar y los productos sean liberados.

(ii) **mecanismos ping-pong**: donde uno o más productos son liberados antes de que todos los sustratos se hayan unido al enzima.

En estos últimos el enzima posee dos o más formas estables, mientras que en los secuenciales sólo hay una forma estable del enzima (Cleland, 1970). Dentro de los mecanismos secuenciales podemos encontrar mecanismos ordenados, en los que los sustratos se combinan y se liberan del enzima en un orden obligado, o mecanismos al azar si existen vías alternativas y el orden de combinación o liberación no es obligado.

El término equilibrio rápido se aplica a mecanismos al azar o a mecanismos ordenados en los cuales ciertas etapas implican la formación de complejos ES que tienen constantes de velocidad unimoleculares para la disociación mucho mayores que la velocidad máxima global, de tal forma que en estado estacionario estas etapas están esencialmente en equilibrio termodinámico (Cleland, 1970).

4.4.1.1 Estudio de velocidad inicial en sistemas terreactantes.

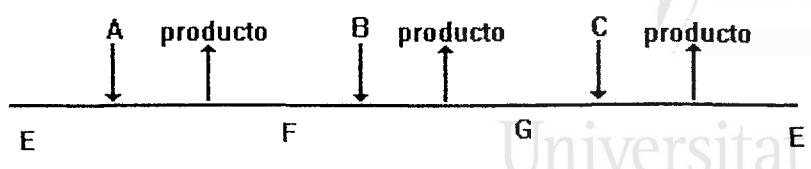
Cuando en una reacción enzimática hay tres sustratos el número de patrones de velocidad inicial es muy grande y la interpretación de los mismos no es tan clara como cuando sólo dos sustratos participan en la reacción. Se han realizado distintas pruebas para poder clasificar los posibles mecanismos terreactantes y distinguirlos en base a los patrones de velocidad inicial y a las representaciones secundarias o terciarias resultantes. Estos esfuerzos están algo limitados porque no se han identificado bien todos los mecanismos posibles, incluyendo diferentes mecanismos cinéticos que podrían ajustarse a las ecuaciones (Viola y Cleland, 1982).

La forma más general de la ecuación es:

$$v = \frac{VABC}{\text{constante} + (\text{coef}A)A + (\text{coef}B)B + (\text{coef}C)C + K_aBC + K_bAC + K_cAB + ABC} \quad (1)$$

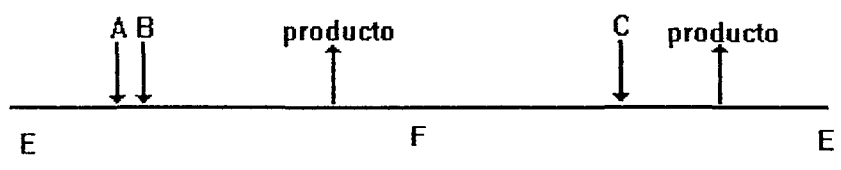
donde V es la velocidad máxima; A, B y C son las concentraciones de reactantes; y K_a , K_b y K_c son las constantes de Michaelis correspondientes. Además, están definidos el término constante y los coeficientes de A, B y C, términos dependientes del mecanismo. Dependiendo de la presencia o ausencia de cualquier término del denominador, se obtienen las ecuaciones de los distintos mecanismos.

Si no está presente el término constante corresponde a un mecanismo tipo Ping-Pong y los patrones de velocidad inicial A-B, B-C y A-C son paralelos. Un ejemplo de este mecanismo es el mostrado por la piruvato deshidrogenasa.



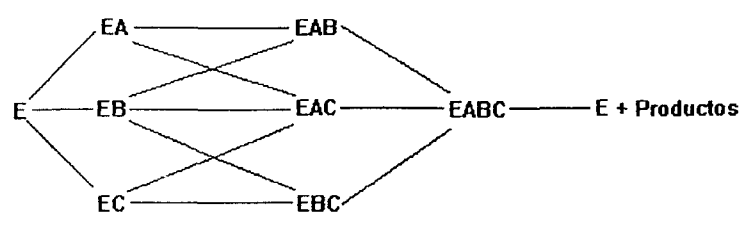
Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

Un gran número de sintetetas poseen un mecanismo Ping-Pong pero con dos reacciones intermedias. En este caso, no sólo falta el término constante en la ecuación sino también han desaparecido los términos A y B; y el C siempre está presente.



Si el término constante está presente estamos ante un mecanismo SECUENCIAL, donde hay formación del complejo EABC. El término ABC normalmente está siempre presente excepto en el tipo de mecanismo Theorell-Chance, en donde al añadir el tercer sustrato se liberan rápidamente los productos y V parece infinita (por ejemplo la reacción reversible del enzima málico a altos pHs) (Viola y Cleland 1982).

Los patrones de velocidad inicial en el mecanismo secuencial son intersecantes cuando se varían A y B, B y C ó A y C a una concentración fija del tercer sustrato y a unos niveles de los distintos sustratos no saturantes. En un mecanismo secuencial ordenado, si se mantiene uno de



los sustratos a concentración saturante (p.ej.: el B), el patrón A-C se hace paralelo permaneciendo los patrones A-B y B-C intersectantes; sin embargo, si el mecanismo es completamente al azar, muestra patrones intersectantes en todos los casos. Si un sustrato (A) se une en primer lugar y los otros dos (B,C) lo hacen al azar, también se obtienen patrones de velocidad inicial intersectantes en todos los casos, excepto cuando se pueden utilizar concentraciones saturantes (del orden de 100 veces la K_M) de B o C. La existencia de un mecanismo parcialmente al azar requiere la realización de más experimentos que los de velocidad inicial para diferenciarlos entre sí (Rudolph y Fromm, 1979), por lo que se recurre a estudios de inhibición para distinguirlos.

En general, los patrones de velocidad inicial únicamente dan información cualitativa, excepto el caso de los valores numéricos de las constantes cinéticas y, en algunas ocasiones es posible obtener las etapas limitantes de velocidad (Cleland, 1970, 1977).

4.4.1.2 Estudios de inhibición por producto.

A partir de los estudios de inhibición se puede obtener gran cantidad de información sobre el mecanismo catalítico, como por ejemplo, el orden de unión de sustratos y liberación de productos (Cleland 1963). Los inhibidores más importantes son los propios productos, ya que un estudio de inhibición por producto ayuda a determinar la forma de la ecuación de velocidad (Cleland, 1967). Los experimentos de inhibición por producto se realizan variando la concentración de un sustrato a varios niveles fijos de uno de los productos, permaneciendo los otros sustratos a una concentración fija a niveles no saturantes. Si uno de los sustratos está saturante, el patrón puede cambiar o la inhibición puede superarse (Cleland, 1967). Dependiendo de que la pendiente, la ordenada o ambas sean una función de la concentración de inhibidor, se observan tres tipos de inhibición: competitiva, acompetitiva o no competitiva, respectivamente. Si

la pendiente o la ordenada son una función lineal de la concentración de inhibidor, la inhibición se denomina lineal, y dichos términos incluyen un factor $(1 + I/K_i)$, donde I es la concentración de inhibidor y K_i es la constante de inhibición. La representación de $1/V$ frente $1/[S]$ a varias concentraciones de inhibidor, dará una familia de rectas intersectantes en el eje vertical para una inhibición competitiva lineal, esto indica que el inhibidor se puede unir a la misma forma del E que el sustrato. La inhibición acompetitiva lineal producirá una familia de rectas paralelas; aquí el inhibidor no puede unirse a la misma forma del enzima que el sustrato, y se une a la forma diferente existente durante o antes de la etapa limitante de velocidad. La inhibición no competitiva lineal genera una familia de rectas que se intersectan a la izquierda del eje de ordenadas pudiendo estar situado este punto en el segundo, tercer cuadrante o en el eje horizontal; en este tipo de inhibición, el inhibidor se une al enzima en el mismo centro, pero en una región diferente de donde lo hace el sustrato (Cleland, 1967).

La inhibición originada por un producto dado puede o no ser del mismo tipo cuando diferentes sustratos se tratan como el sustrato variable, y el patrón, así como los valores numéricos de las constantes de inhibición, pueden depender de la concentración de los sustratos no variados. La totalidad de los patrones de inhibición por producto genera una gran información sobre la forma de la ecuación de velocidad que puede ser utilizada para deducir el mecanismo. En la tabla M.1. se muestran algunos patrones de inhibición por producto para sistemas terreactantes.

4.4.1.3 Inhibición por análogos de sustratos, inhibición competitiva.

Aunque los inhibidores competitivos se habían empleado en muchos experimentos enzimáticos, su utilización para realizar una elección de un mecanismo cinético entre posibles alternativas no se tuvo en cuenta hasta 1962, cuando Fromm y Zewe (1962) sugirieron que los inhibidores

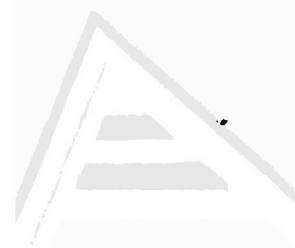
acompetitiva. MT=Inhibición mixta o no competitiva (Segel, 1975).

Sustrato Variable

Mecanismo	Producto Inhibidor	A			B			C		
		Insaturado	Saturado con B	Saturado con C	Insaturado	Saturado con A	Saturado con C	Insaturado	Saturado con A	Saturado con B
Ordenado Ter Bi	P	MT	UC	UC	MT	MT	UC	MT	MT	MT
	Q	C	C	C	MT	-	MT	-	-	UC
Ordenado Bi Ter	P	MT	UC	UC	MT	MT	UC	MT	UC	
	Q	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	
	R	C	C	C	UC	-	UC	-	-	
Uni Uni Uni Bi Ping Pong Bi Ter	P	MT	-	-	C	C	C	C	C	
	Q	UC	UC	UC	MT	MT	MT	MT	MT	
	R	C	C	C	MT	-	MT	-	-	
Uni Bi Uni Uni Ping Pong Bi Ter	P	MT	MT	UC	UC	UC	UC	UC	UC	
	Q	UC	-	-	C	C	C	C	C	
	R	C	C	C	MT	-	MT	-	-	
Bi Uni Uni Uni Ping Pong Ter Bi	P	MT	UC	-	MT	MT	-	MT	C	C
	Q	C	C	C	MT	MT	MT	MT	-	MT
Uni Uni Bi Ping Pong Ter Bi	P	MT	-	MT	C	C	C	C	MT	-
	Q	C	C	C	MT	MT	UC	-	-	MT

competitivos de sustratos podían emplearse para diferenciar entre mecanismos al azar y ordenados. En el caso de los ordenados podría hacerse una determinación del orden de unión de los sustratos a partir de estos experimentos (Fromm, 1979). También aportan la ventaja de permitir llegar a conclusiones definitivas en estudios de reacciones en una sola dirección. Su limitación es la necesidad de disponer de un inhibidor competitivo para cada sustrato, sin embargo, cuando se dispone de datos de velocidad inicial, puede obtenerse información valiosa del mecanismo cinético a partir de experimentos con un sólo análogo de sustrato, incluso para sistemas Bi y Ter (Fromm, 1979). En estos estudios se asume que el inhibidor competitivo, que usualmente es un análogo de sustrato, cuando se une al enzima no permite la formación de producto; estos inhibidores se denominan **dead-end**, en contraste con inhibidores parcialmente competitivos, que al unirse con el enzima permiten la formación de producto. Normalmente un inhibidor competitivo compite con el sustrato por el mismo centro en el enzima, aunque si compiten por diferentes centros y la unión es mutuamente exclusiva, se obtienen entonces resultados cinéticos idénticos a si se unieran en el mismo centro (Fromm, 1979).

Los mecanismos cinéticos de enzimas que utilizan tres sustratos pueden dividirse en dos categorías: Ping-pong y Secuenciales. Es posible hacer una elección del mecanismo entre estos sistemas terreactantes usando inhibidores competitivos dead-end para los sustratos. En la tabla M.2 se muestran los patrones de inhibición esperados para algunos mecanismos. Un aspecto práctico a tener en cuenta es que al realizar estos estudios, el sustrato fijo debe mantenerse a una concentración insaturante, a ser posible en la región de su constante de Michaelis.



T A B L A M.2
Patrones de inhibición competitiva para varios mecanismos de tres sustratos (Fromm, 1979)

Mecanismo	Inhibidor Competitivo para el sustrato	1/A	1/B	1/C
Ordenado Ter Ter y Ter Bi	A	C ^a	N ^{b,c}	N ^e
	B	U ^d	C	N ^f
	C	U	U	C
Random Ter Ter y Ter Bi	A	C	N	N
	B	N	C	N
	C	N	N	C
Random AB	A	C	N	C ^g
	B	N	C	C ^g
	C	U	U	C
Random BC	A	C	N	N
	B	U	C	N
	C	U	N	C
Random AC	A	C	N	N
	B	N	C	N
	C	N	N	C
Hexa Uni Ping-Pong	A	C	U	U
	B	U	C	U
	C	U	U	C
Ordenado Bi Uni Uni Bi Ping-Pong	A	C	N ⁱ	U
	B	U	C	U
	C	U	U	C
Ordenado Uni Uni Bi Bi Ping-Pong	A	C	U	U
	B	U	C	N ⁱ
	C	U	U	C
Random Bi Uni Uni Bi Ping-Pong	A	C	N	U
	B	N	C	U
	C	U	U	C
Random Uni Uni Bi Bi Ping Pong	A	C	U	U
	B	U	C	N
	C	U	N	C

^aInhibición competitiva. ^bInhibición no competitiva. ^cSi EI reacciona con B para formar EIB, la representación sería no lineal. ^dInhibición acompetitiva. ^eSi EIB reacciona con C para formar EIBC, la representación sería no lineal. ^f Si EAI reacciona con C para formar EAIC, la representación sería no lineal. ^gSi EIB reacciona con C para formar EIBC, la representación sería no competitiva. ^hSi EIA reacciona con C para formar EIAC, la representación sería no competitiva. ⁱSi EI reacciona con B para formar EIB, la representación sería no lineal. ^jSi FI reacciona con C para formar FIC, la representación sería no lineal.

Los inhibidores competitivos dead-end han sido ampliamente utilizados para discernir entre mecanismos al azar y ordenados (Fromm y Zewe, 1962; Park et al., 1984; Carvajal y Kessi, 1988). También se emplean para determinar el orden de unión de los sustratos al enzima en los casos de mecanismo ordenado (Bonete et al., 1989, 1990), siendo en este caso, al menos teóricamente, el método menos ambiguo para determinar la secuencia de unión.

Estos procedimientos presentan ciertas limitaciones, pero no más que cualquier otro método cinético, por ejemplo, no nos permiten diferenciar entre mecanismos Iso y convencionales, ni pueden utilizarse para elegir entre mecanismos Theorell-Chance y otros análogos que impliquen complejos centrales de vida larga; por otro lado, es una herramienta poderosa para el estudio cinético de enzimas (Fromm, 1979).

4.4.1.4 Ejemplos de enzimas con distintos tipos de mecanismos.

MECANISMOS TOTALMENTE AL AZAR

Glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (Engel y Dalziel, 1970; Silverstein y Sulebele, 1974; Rife y Cleland 1980).

Enzima mállica de *Ascaris suum* (Kiick et al., 1984; Park et al., 1984).

6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Candida utilis* (Berdis y Cook, 1993).

Dihidropirimidina deshidrogenasa de hígado bovino en la reducción de uracilo por NADPH (Porter y Spector, 1993).

Isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* (Dean y Koshland, 1993) en ambas direcciones, pudiéndose formar complejos abortivos del tipo E-Iso-NADPH y E- α Kg-NADP.

MECANISMOS PARCIALMENTE AL AZAR

Octopina deshidrogenasa de *Pecten maximus* (Schrimsher y Taylor, 1984).

Aspartasa de *Hafnia alvei* (Nuiry et al., 1984), con liberación ordenada en equilibrio rápido de productos.

Malato deshidrogenasa de *Rhodopseudomonas capsulata* (Ohshima y Sakuraba, 1986), con liberación ordenada de productos.

Octopina deshidrogenasa de *Concholepas concholepas* (Carvajal y Kessi, 1988).

Glutamato deshidrogenasa de *Clostridium symbiosum* en la reacción de aminación (Syed, Engel y Parker, 1991).

MECANISMOS PING-PONG

NAD-gliceraldehído 3-P deshidrogenasa de *Pisum sativum* (Duggleby y Dennis, 1974), del tipo Bi Uni Uni Uni.

Metilamina deshidrogenasa de la bacteria W3A1 (McIntire, 1987).



MECANISMOS ORDENADOS

Alanina deshidrogenasa de *H.halobium* (Sahagún, 1988).

NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* (Bonete et al., 1989),
con la formación de un complejo abortivo E-2-KG bajo condiciones salinas.

NADP-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* (Bonete et al.,
1990), bajo condiciones salinas.



4.4.2 Mecanismo cinético de glutamato deshidrogenasa.

4.4.2.1 Introducción.

Las primeras referencias sobre el mecanismo cinético de glutamato deshidrogenasa se sitúan al final de la década de los 50, Frieden (1959) propuso que el mecanismo de glutamato deshidrogenasa implicaba un orden obligatorio de unión de sustratos con el enzima, siendo el complejo E-coenzima el primero que se formaba. Estudios posteriores indicaron que este modelo era incorrecto. Engel y Dalziel (1969), estudiando la desaminación oxidativa de L-glutamato y norvalina, propusieron que se podían excluir ciertos mecanismos de orden obligatorio, aunque sus datos no indicaban necesariamente una unión al azar. Más tarde los estudios de velocidad inicial de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato (Engel y Dalziel, 1970) mostraron que el mecanismo debía implicar, al menos, una unión al azar de los tres sustratos con interconversión de los complejos centrales como etapa limitante de la velocidad. Por aquel entonces mediante estudios espectrofotométricos de la unión de sustratos (Cross et al., 1972; Prough et al., 1972) demostraron la existencia de complejos ternarios y binarios necesarios para un mecanismo al azar (Engel y Chen, 1975).

En la reacción de aminación catalizada por NAD-GDH de *Clostridium* SB₄ la representación doble inversa de amonio, manteniendo el 2-oxoglutarato a varios niveles fijos, fue intersectante para concentraciones saturantes de NADH, mientras que a concentración constante de 2-oxoglutarato o amonio las representaciones fueron paralelas. Según Cleland (1963) esta distribución de representaciones indica un mecanismo secuencial en donde el segundo y tercer sustratos se combinan al azar con el complejo E-NADH. Como los patrones paralelos se observaron con NADH y 2-oxoglutarato a concentraciones saturantes de amonio, y con NADH y amonio a niveles elevados de 2-oxoglutarato, los datos se

ajustaron a un mecanismo secuencial en el que NADH se unió primero al enzima seguido por 2-oxoglutarato y amonio al azar (Winnacker y Barker, 1970).

Recientemente se ha descrito que la reacción de desaminación catalizada por glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente de *Clostridium symbiosium* (Syed et al., 1991) está dominada por un mecanismo secuencial ordenado y, sin embargo, la reacción de aminación reductiva en la cual participan tres sustratos sigue un mecanismo parcialmente al azar.

En la tabla M.3, se muestra el tipo de mecanismo cinético propuesto para distintas glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes. Se observa que existe una gran controversia sobre el mecanismo cinético que sigue este enzima. Se han descrito desde mecanismos secuencial ordenados, como es el caso de la GDH de hígado bovino (Frieden, 1959), NAD-GDH de *H. halobium* (Bonete et al., 1989), etc., hasta un mecanismo alostérico para la NAD-GDH de *T. novellus* en ausencia de activador (AMP), mientras que en su presencia muestra un mecanismo secuencial ordenado, pasando por mecanismos parcialmente al azar tipo BC, NAD-GDH de *Clostridium SB₄* (Winnacker y Barker, 1970) o para la reacción de aminación reductiva de *Clostridium symbiosium* (Syed et al., 1991), y totalmente al azar descrito para la GDH bovina (Engel y Chen, 1970; Cohen et al., 1977) reflejándose en este enzima la mayor controversia al haber sido la más estudiada de las GDH.

En halófilos, concretamente en *Halobacterium halobium* estudiada en este Departamento, se han descrito dos glutamato deshidrogenasa, una NADP-dependiente y otra NAD-dependiente para las que se han analizado sus mecanismos cinéticos. La glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente, presenta un mecanismo secuencial ordenado, uniéndose primeramente el coenzima NAD y posteriormente el L-glutamato, liberándose amonio, 2-oxoglutarato y NADH en dicho orden, siendo necesario postular

..... Propietario para su uso personal. No se permite la explotación económica ni la transformación de esta obra. Queda permitida la impresión en su totalidad.

FUENTE

COENZIMA

MECANISMO

Referencia

Hígado bovino	NAD/NADP	ORDENADO	Frieden (1959)
Hígado bovino	NAD/NADP	ORDENADO	Fisher (1960)
Hígado de rana	NAD	ORDENADO	Fahien y col. (1965)
<i>T. novellus</i>	NADP	ORDENADO	Léjohn et al. (1968)
	NAD	ORDENADO(con activador)	Léjohn et al. (1968)
	NAD	ALOSTERICO(sin activador)	Léjohn et al. (1968)
<i>B. emersonii</i>	NAD	ORDENADO	Léjohn et al. (1969)
Hígado bovino	NAD/NADP	AL AZAR	Engel y Dalziel (1969, 1970)
<i>Clostridium SB₄</i>	NAD	PARCIAL AL AZAR TIPO BC	Winnacker y Baker (1970)
Hígado bovino	NAD/NADP	AZAR (desaminación)	Colen et al. (1972)
		ORDENADO (aminación)	
<i>S. typhimurium</i>	NADP	ORDENADO	Coulton y Kapoor (1973)
Hígado bovino	NAD/NADP	ORDENADO	Silvestein y Sulebele (1973)
Hígado bovino	NAD/NADP	AL AZAR	Engel y Chen (1975)
Hígado bovino	NAD/NADP	AL AZAR	Colen y col. (1977)
Hígado bovino	NAD/NADP	AZAR (desaminación)	Rife y Cleland (1980)
		ORDENADO (aminación)	
<i>Halobacterium halobium</i>	NAD	ORDENADO(con formación de complejo abortivo) desaminación	Bonete y col. (1989)
<i>Halobacterium halobium</i>	NADP	ORDENADO (aminación)	Bonete et al. (1990)
<i>Clostridium symbosium</i>	NAD	ORDENADO (desaminación)	Syed y col. (1991)
		PARCIAL AL AZAR (aminación)	



la formación de complejos abortivos del tipo E-2-oxoglutarato (Bónete et al., 1989); tales complejos ya habían sido postulados para otras GDHs. La GDH NADP-dependiente presenta un mecanismo secuencial ordenado al igual que la anterior, pero en él no se necesitó la formación de complejos abortivos para la explicación de los datos obtenidos (Bonete et al., 1990).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



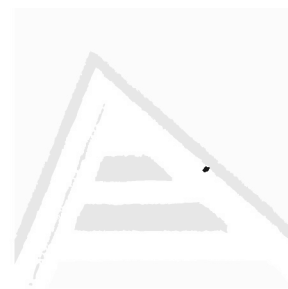
4.4.2.2 Metodología.

El estudio se realizó en tampón Tris-HCl, pH=8.5, EDTA 2 mM y en ausencia de sal. Se llevó a cabo tanto el análisis de las velocidades iniciales como el de inhibición por producto. Primeramente, dado que el enzima es halofílico se estudió si había una pérdida significativa de actividad durante el tiempo de ensayo. Una vez comprobado que dicha pérdida no era significativa (Fig.M.1) se siguió con los estudios anteriormente citados.

El estudio de velocidades iniciales se realizó manteniendo un sustrato fijo y variando los otros dos, y posteriormente cambiando la concentración del fijo; se llevó a cabo tanto para el 2-oxo-glutarato como sustrato fijo como para el amonio. Todos los sustratos estaban en condiciones no saturantes y las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla M.4

Tabla M.4 : Concentraciones a las que se realizó el estudio de velocidades iniciales.

SUSTRATO FIJO AMONIO mM	SUSTRATOS VARIABLES	
	2-KG mM	NADPH μ M
3.5	2	15
6.3	2.6	19
10.5	3.6	27
15	6	45
	18	135
2-KG mM	NH_4^+ mM	NADPH μ M
4	3.5	15
8	4.5	19
12	6.5	27
18	10.5	45
	31.5	135



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

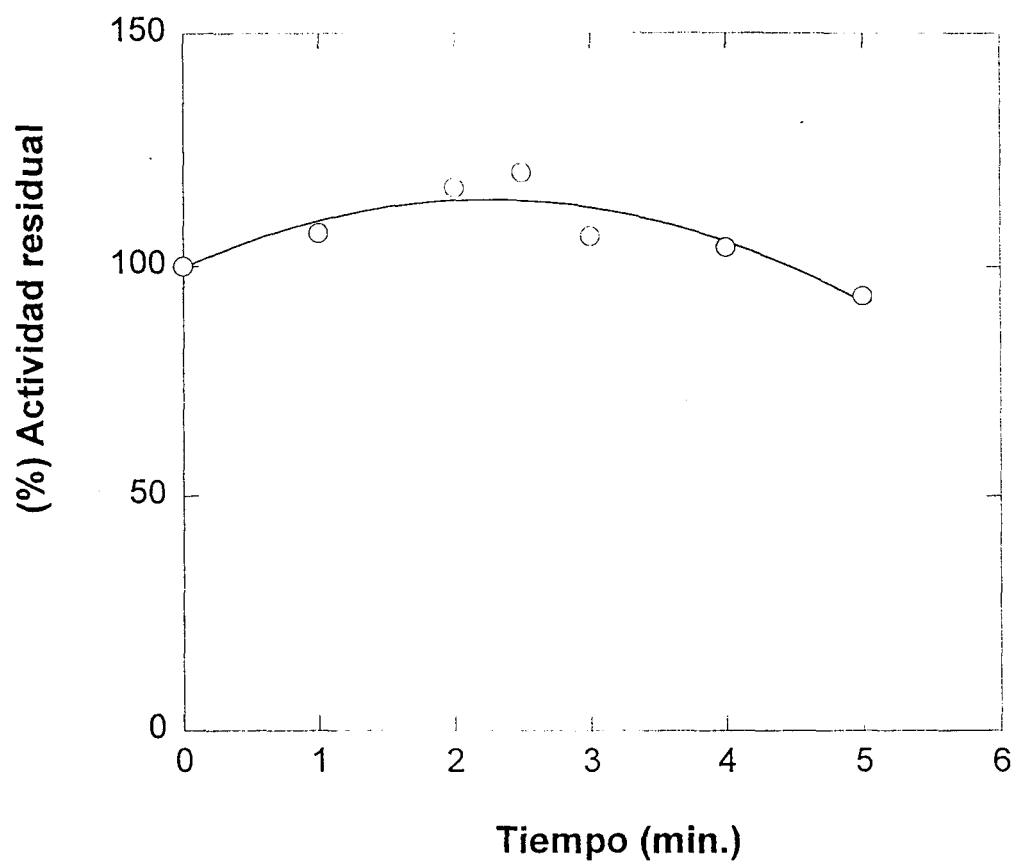


Figura M.1: Pérdida de actividad del enzima durante el tiempo de ensayo en ausencia de sal. El 100 % se refiere a la actividad a tiempo cero.

Se efectuaron las representaciones primarias, secundarias y terciarias para poder identificar qué términos de la ecuación de velocidad (1) están presentes, y se determinó el tipo de mecanismo siguiendo los patrones publicados por Viola y Cleland en 1982 sobre análisis de velocidades iniciales para mecanismos terreactantes (Tabla M.5).

Tabla M.5: Identificación de los términos de la ecuación de velocidad por análisis de las representaciones 2^{arias} y 3^{arias} de los patrones de velocidad inicial para mecanismos terreactantes (Viola y Cleland, 1982).

Parámetros de representaciones	Termi.
Ordenada de 3^{arias} frente 1/B de ordenadas de 2^{arias} frente 1/A de ordenadas de 1^{arias} frente 1/C	ABC
Pendiente de 3^{arias} frente 1/B de ordenadas de 2^{arias} frente 1/A de ordenadas de 1^{arias} frente 1/C	K_bAC
Ordenada de 3^{arias} frente 1/B de pendientes de 2^{arias} frente 1/A de ordenadas de 1^{arias} frente 1/C	K_aBC
Pendiente de 3^{arias} frente 1/B de pendientes de 2^{arias} frente 1/A de ordenadas de 1^{arias} frente 1/C	C
Ordenada de 3^{arias} frente 1/B de ordenadas de 2^{arias} frente 1/A de pendientes de 1^{arias} frente 1/C	K_cAB
Pendiente de 3^{arias} frente 1/B de ordenadas de 2^{arias} frente 1/A de pendientes de 1^{arias} frente 1/C	A
Ordenada de 3^{arias} frente 1/B de pendientes de 2^{arias} frente 1/A de pendientes de 1^{arias} frente 1/C	B
Pendiente de 3^{arias} frente 1/B de pendientes de 2^{arias} frente 1/A de pendientes de 1^{arias} frente 1/C	cte.

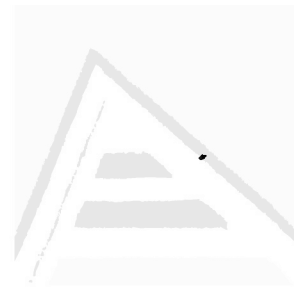
El que la pendiente o la ordenada posea un valor cero significa la ausencia del término indicado en el denominador de la ecuación de velocidad.

Se estudió la inhibición por producto para identificar el orden de unión de los sustratos. En la tabla M.6 se detallan las concentraciones y condiciones utilizadas. Los sustratos se mantuvieron a concentraciones insaturantes.

A la vista de los resultados obtenidos tanto del análisis de velocidades iniciales como de los desprendidos del estudio de inhibidores por producto, se realizó también un estudio de inhibidores competitivos de sustrato para determinar inequívocamente el tipo de mecanismo. Las concentraciones utilizadas así como los inhibidores se detallan en la tabla M.7.

Tabla M.6 : Concentraciones empleadas en el estudio de inhibición por producto.

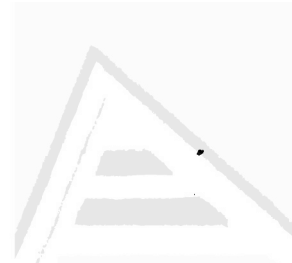
Sustrato variable	concentr. (mM)	Inhibidor producto	concentra. (mM)	Sustratos fijos	concentr. (mM)
2-KG	2	L-glu	0	NADPH	0.050
	2.6		2		
	3.6		5		
	6		10		
	18		15		
NADPH (μM)	15	NADP	0	2-KG	10
	19		10		
	27		25		
	45		50		
	135		100		
NADPH (μM)	15	L-glu	0	2-KG	10
	19		2		
	27		5		
	45		10		
	135				
NH_4^+	3.5	L-glu	0	2-KG	100
	4.5		2		
	6.3		5		
	10.5		10		
	31.5				



T A B L A M.7

Concentraciones e inhibidores competitivos utilizados en el estudio de inhibición por análogos de sustratos. Los inhibidores empleadas fueron ácido glutárico e hidroxilamina. Todas las concentraciones están expresadas en mM.

Sustrato variable		Inhibidor competitivo sust.		Sustratos fijos			
2-KG	2	Glutarato	0	NADPH	0.05 mM		
	2.6		10			Amonio	35 mM
	3.6		20				
	6		40				
	18						
NADPH	0.015	Glutarato	0	Amonio	35 mM		
	0.019		10			2-KG	10 mM
	0.027		20				
	0.045		40				
	0.135						
Amonio	3.5	Glutarato	0	NADPH	0.05 mM		
	4.5		7			2-KG	10 mM
	6.3		8				
	10.5		9				
	31.5						
Amonio	3.5	OH-amina	0	NADPH	0.05 mM		
	4.5		2			2-KG	10 mM
	6.3		5				
	10.5		10				
	31.5						
2-KG	2	OH-amina	0	NADPH	0.05 mM		
	2.6		2			Amonio	35 mM
	3.6		5				
	6		10				
	18						



4.4.2.3 Resultados.

El estudio de velocidades iniciales se realizó utilizando tanto amonio como 2-oxoglutarato como sustrato variable, en los dos casos, en la reacción de aminación reductiva, se obtuvo un patrón de rectas intersectantes, Figura M.2 y Figura M.3, patrón que corresponde a un mecanismo de tipo secuencial, descartándose un mecanismo de tipo Ping-pong, ya que ninguna de estas representaciones presentaba un patrón paralelo. Asimismo, se efectuaron las representaciones secundarias y terciarias para los dos sustratos variables. Cuando el amonio era el sustrato variable, se realizaron las representaciones 2^{arias} de pendientes y ordenadas para cada concentración de 2-oxoglutarato frente a la inversa de la concentración de NADPH, Figura M.4a y Figura M.5a respectivamente, y las representaciones 3^{arias} , pendientes y ordenadas de las representaciones anteriores, frente a la inversa de la concentración de 2-oxoglutarato (Figura M.4b, M.4c y Fig. M.5b, M.5c respectivamente). De esta forma se pudo analizar gráficamente qué tipo de mecanismo, de acuerdo con Viola y Cleland (1982). Del análisis de estas representaciones 2^{arias} y 3^{arias} se desprende que estos patrones se ajustaron a un mecanismo en el que los términos ausentes en el denominador de la ecuación de velocidad (1) fueron B y K_bAC . Esto se obtiene al comparar los valores de pendientes y ordenadas de las representaciones 3^{arias} en la Tabla M.5.

Cuando el sustrato variable fue 2-oxoglutarato el procedimiento fue el mismo, Figuras M.6,a,b,c y M.7,a,b,c, los resultados obtenidos fueron idénticos.

Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

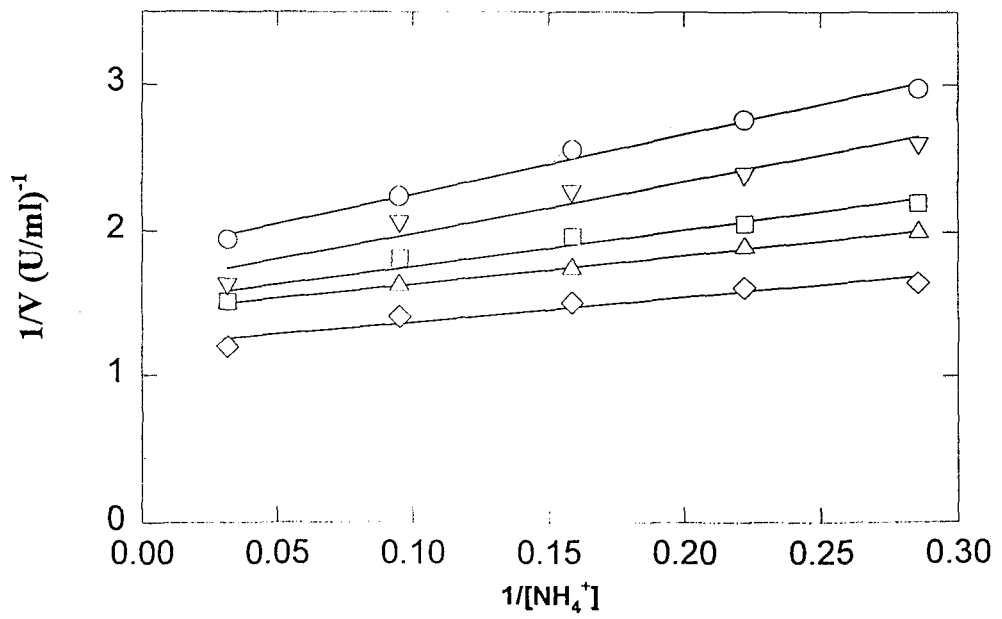
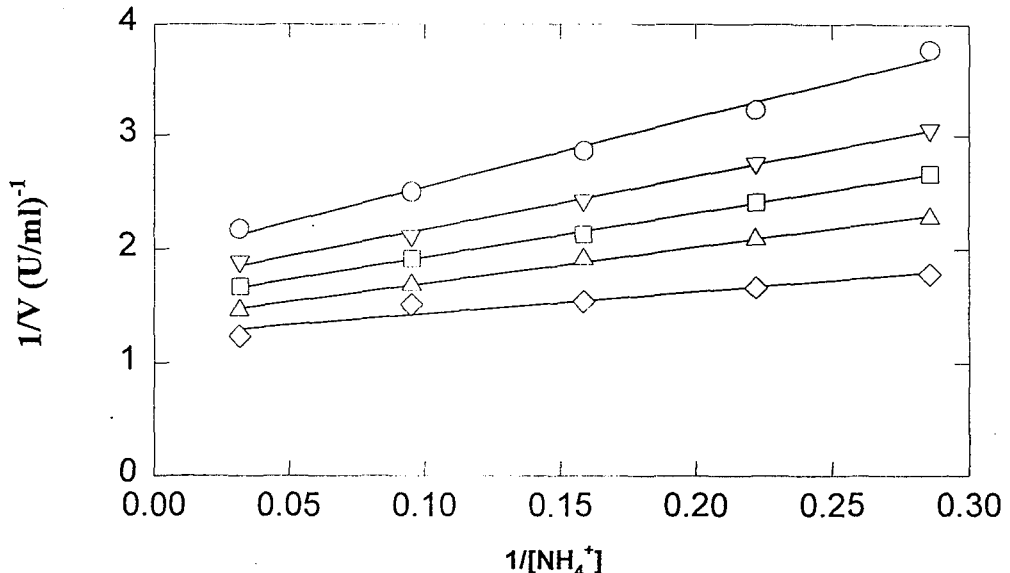
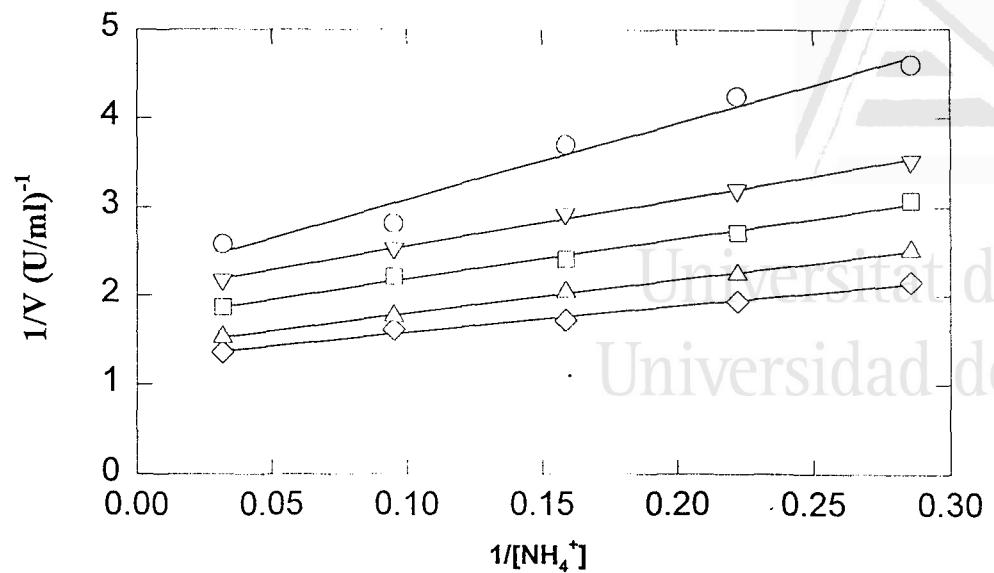


Figura M.2.: Representaciones primarias de inversas de velocidad frente a inversas de la concentración de amonio, para distintas concentraciones de NADPH (○) 0.015, (▽) 0.019, (□) 0.027, (△) 0.045, (◇) 0.135 mM,

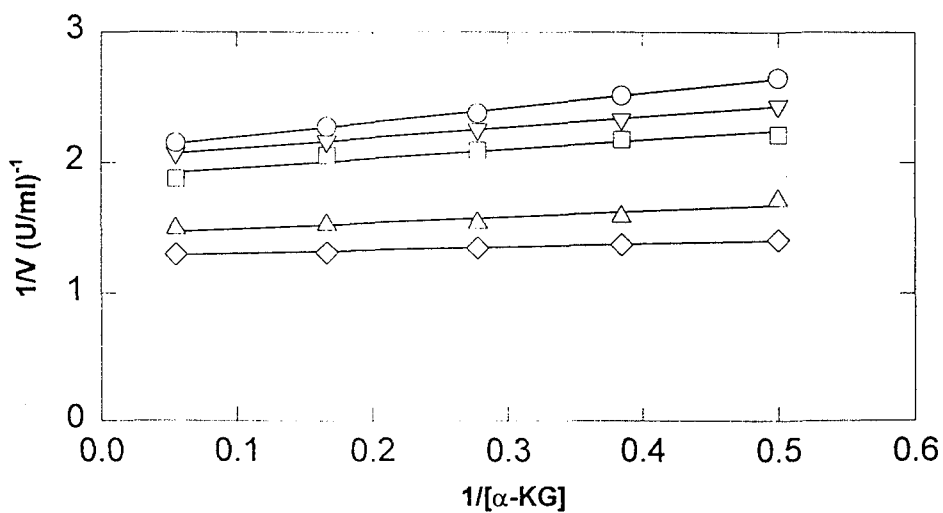
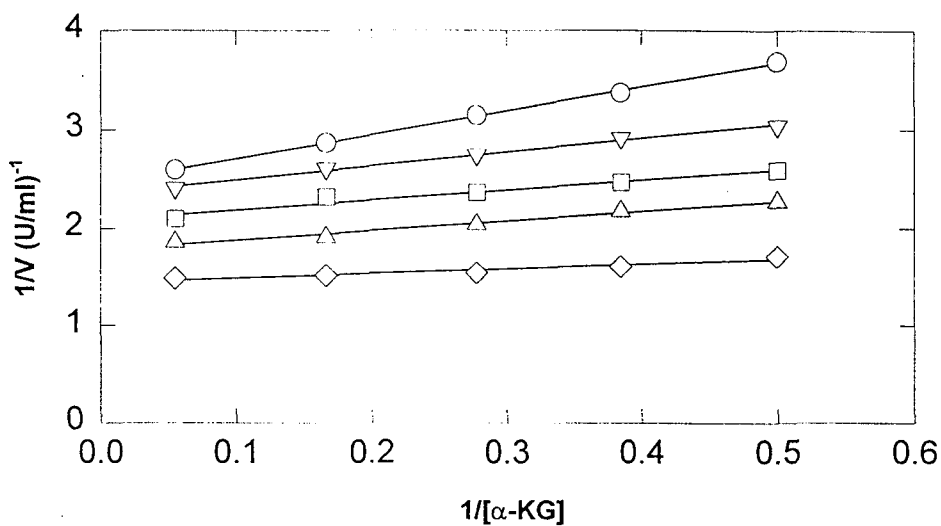
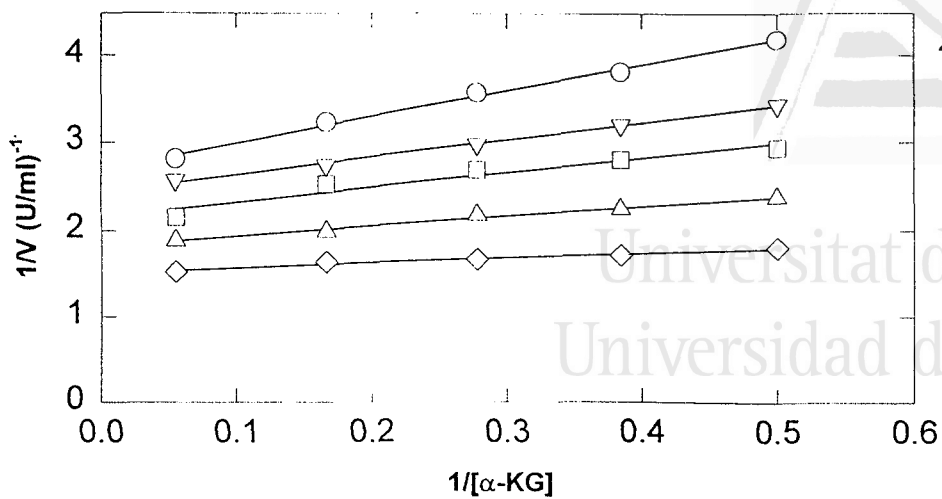


Figura M.3.: Representaciones primarias de inversas velocidad frente inversas de la concentración de 2-KG (sustrato variable), para distintas concentraciones de NADPH, (○) 0.015,(▽) 0.019,(□) 0.027,(△) 0.045 y (◇) 0.135 mM; y las concentraciones de amonio 3.5 , 6.3 , 15 mM respectivamente.

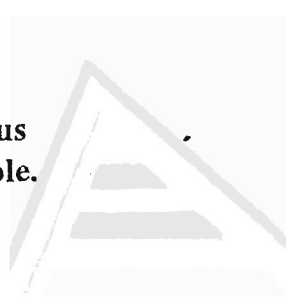


Figura M.4: Representaciones secundarias de pendientes y sus correspondientes terciarias, siendo amonio el sustrato variable.

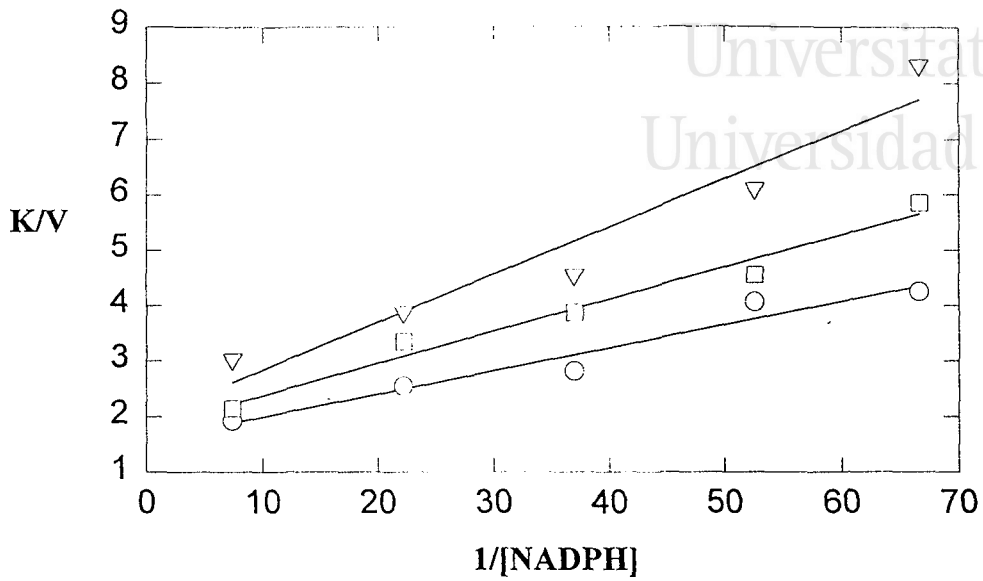


Figura M.4a:
Representaciones secundarias de las pendientes de las representaciones primarias de inversas de velocidad inicial frente a la inversa de la concentración de amonio, frente a la inversa de la concentración de NADPH. Para las concentraciones de α-KG (∇) 8 mM, (□) 12 mM, (○) 18 mM.

M.4b:
Representaciones terciarias de pendientes de representaciones secundarias frente inversas a las concentraciones α-KG.

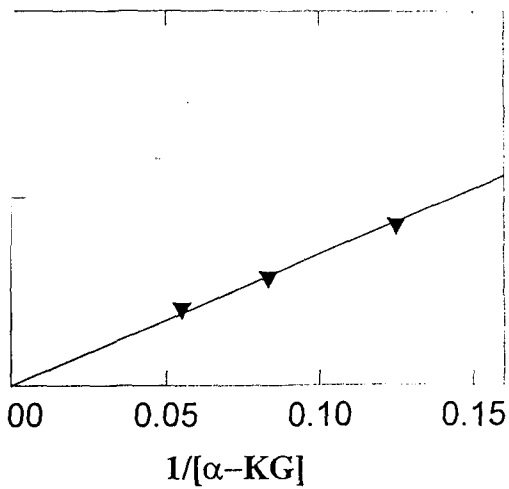
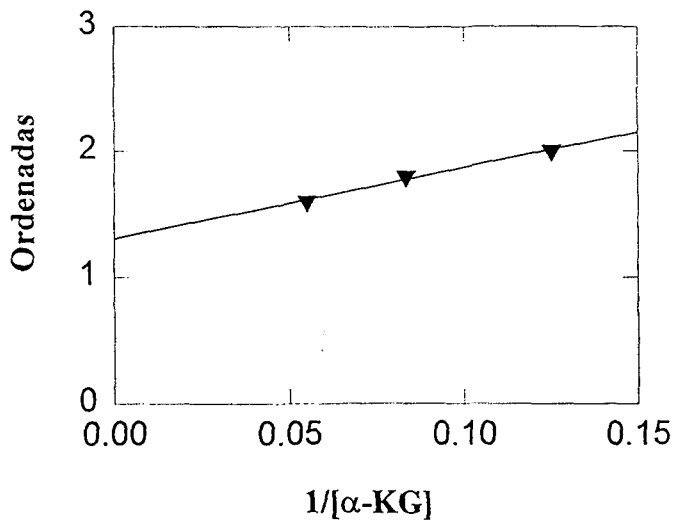


Figura M.4c:
Representación terciaria de ordenadas de representaciones secundarias frente inversa a la concentración de α-KG.



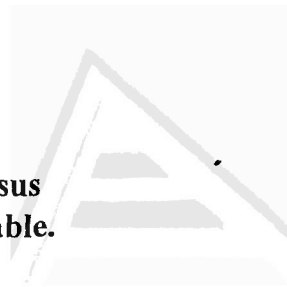


Figura M.5: Representaciones secundarias de ordenadas y sus correspondientes terciarias, siendo amonio el sustrato variable.

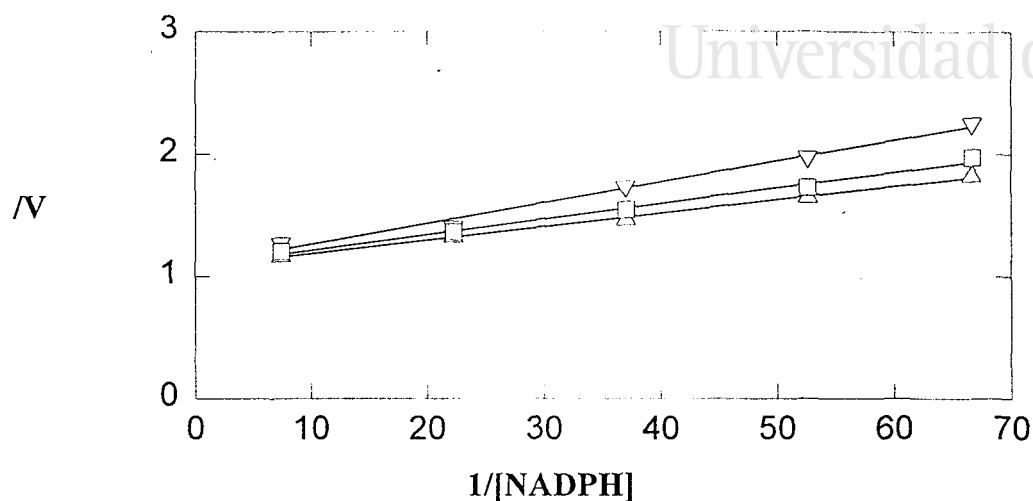


Figura M.5a:
Representaciones secundarias de las ordenadas, de las representaciones primarias de inversas de velocidad frente a la inversa de concentraciones de amonio, frente a la inversa de la concentración de NADPH.
α-KG ▽ 8 mM, □ 12 mM, △ 18 mM.

Figura M.5b:
Representación terciaria de pendientes de representaciones secundarias de ordenadas frente inversas de α-KG.

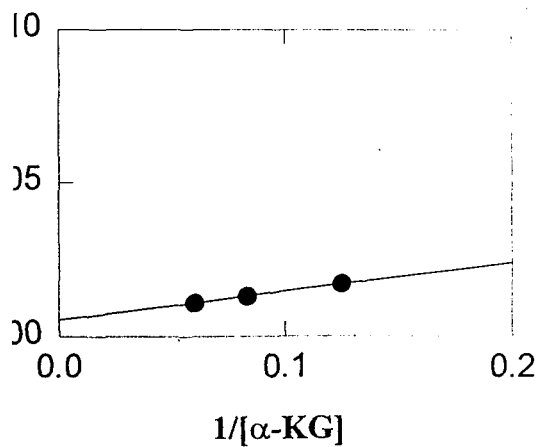
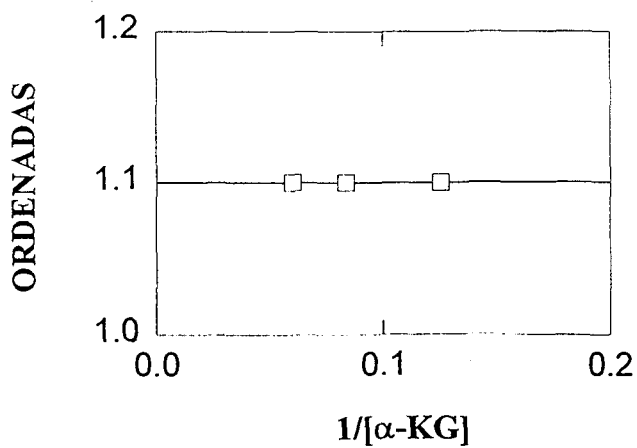


Figura M.5c:
Representación terciaria de ordenadas de representaciones secundarias de ordenadas frente inversas de α-KG.



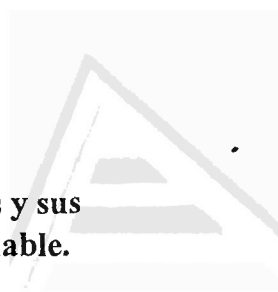


Figura M.6: Representaciones secundarias de pendientes y sus correspondientes terciarias, siendo α -KG el sustrato variable.

Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

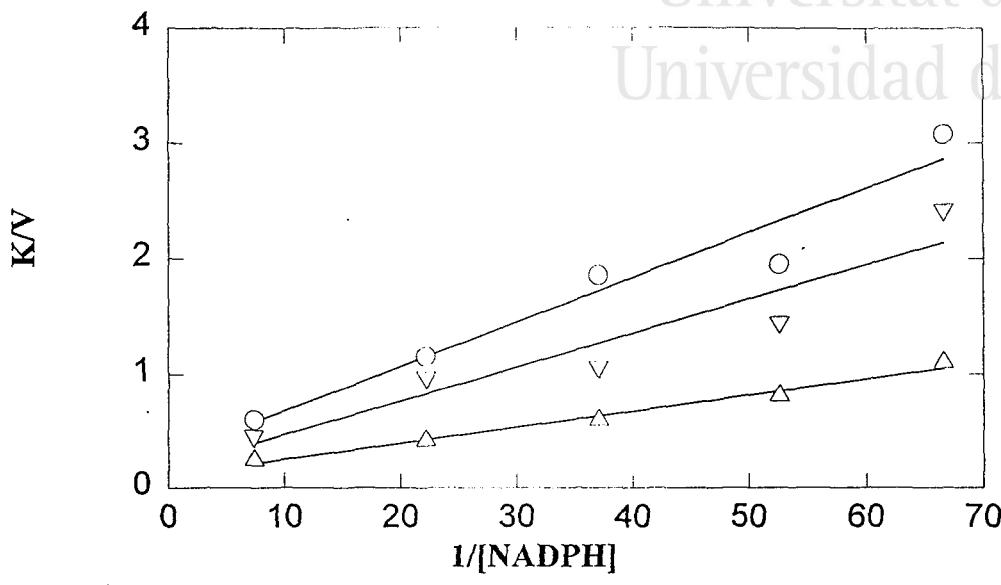


Figura M.6a:
 Representaciones secundarias de las pendientes, de las representaciones primarias de inversas de velocidad frente a inversa de concentraciones de α -KG, frente a la inversa de la concentración de NADPH. Amonio
 ○ 3.5 mM, ▽ 6.3 mM, △ 15 mM.

Figura M.6b:
 Representación terciaria de pendientes de representaciones secundarias de pendientes frente a inversas de amonio.

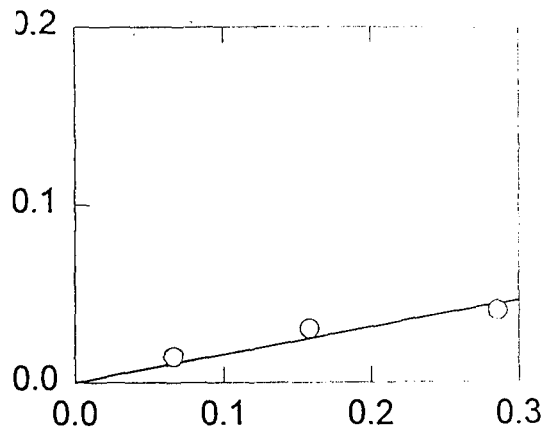
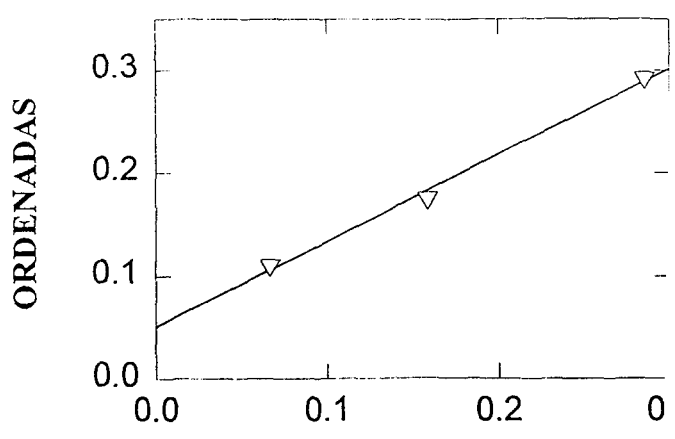


Figura M.6c:
 Representación terciaria de ordenadas de representaciones secundarias de pendientes frente a inversas de amonio.



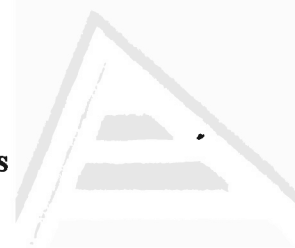


Figura M.7: Representaciones secundarias de ordenadas y sus correspondientes terciarias, siendo α -KG el sustrato variable

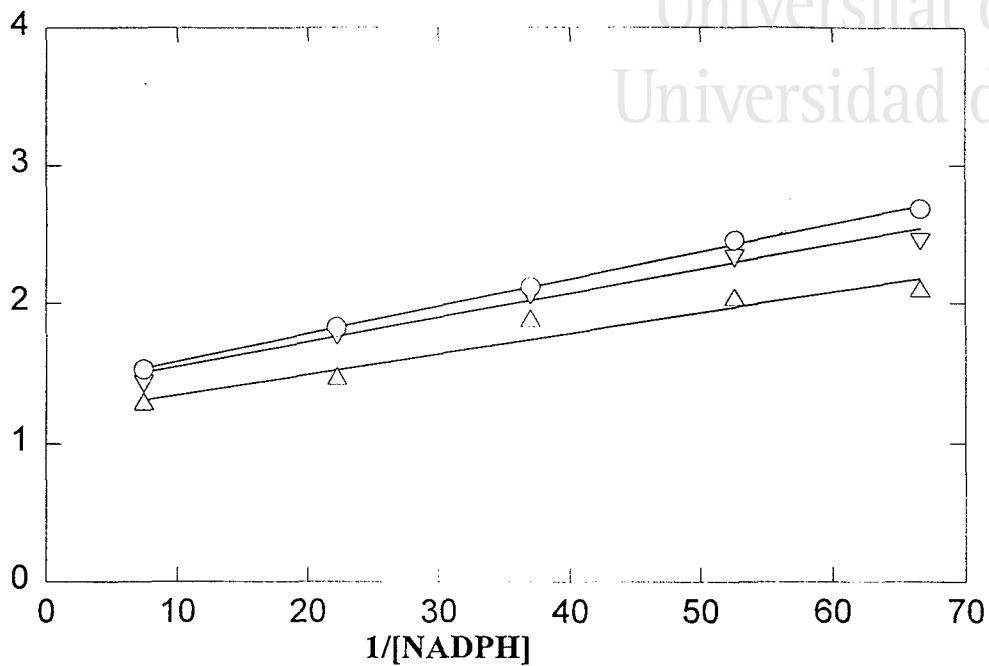


Figura M.7a: Representaciones secundarias de las ordenadas, de las representaciones primarias de inversas de velocidad frente a inversa de concentraciones de α -KG, frente a la inversa de la concentración de NADPH. Amonio
 ○ 3.5 mM, ▽ 6.3 mM, △ 15 mM.

Figura M.7b: presentación terciaria de pendientes de representaciones secundarias de ordenadas, frente a inversas de amonio.

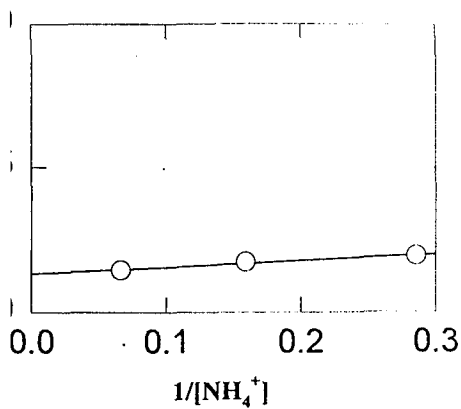
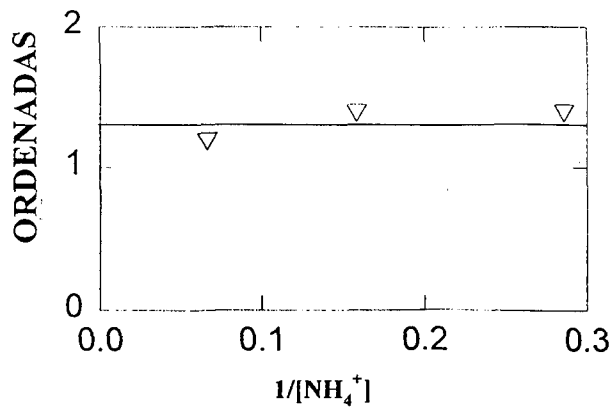


Figura M.7c: Representación terciaria de ordenadas de representaciones secundarias de ordenadas, frente a inversas de amonio.



Este mecanismo, donde B y K_bAC están ausentes, conlleva la no formación de los complejos E-B y EAC, pudiendo ser añadidos en primer lugar A ó C. El mecanismo más probable es un ordenado con adición de A en estado estacionario, seguido de la adición de B siendo esta etapa de equilibrio rápido, también se produciría un complejo abortivo entre el enzima libre y C (mecanismo 1). Otro mecanismo posible sería la adición de A y B en equilibrio rápido, éste es muy improbable, formándose complejo abortivo E-BC.

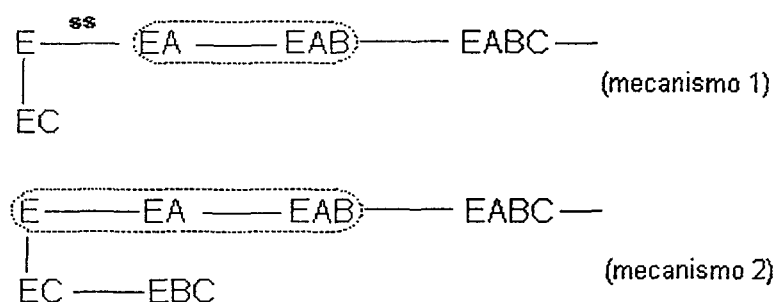


Figura M.8: Posibles mecanismos cinéticos para la NADP-GDH

La ecuación de velocidad correspondiente a estos mecanismos es:

$$v = \frac{V_{\max} A B C}{cte + cofAA + cofCC + K_aBC + K_cAB + ABC} \quad (2)$$

Una vez que en el análisis gráfico se establecieron qué términos estaban presentes o ausentes, los datos fueron ajustados a la ecuación de velocidad (2). Como se refleja en la Tabla M.8, cuando se fueron adicionando los términos eliminados de la ecuación y se realizó de nuevo el ajuste, se observó que la variación de σ no era significativa, por contra el error estandar de los parámetros aumentaba considerablemente, incluso en el caso de K_bAC superó al propio valor, indicando esto que dichos términos no estaban presentes en la ecuación de velocidad, confirmandose de este modo el análisis gráfico.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla M.8: Comparación del ajuste por mínimos cuadrados de los patrones de velocidad inicial a la ecuación (2).

Parámetros	Estimación ecuación (2)	Estimación cuando se adiciona K_b a la ecuación (2)	Estimación cuando se añaden K_b y B
V	0.90±0.02	0.94±0.05	0.89±0.05
K_a	0.006±0.001	0.007±0.002	0.004±0.002
K_b	—	0.56±0.60 ^a	0.02±0.07 ^a
K_c	0.9±0.2	1.1±0.3	0.59±0.45
Cof A	10±3	9±3	13±4
Cof B	—	—	0.019±0.014
Cof C	0.066±0.012	0.06±0.02	0.08±0.02
cte	0.55±0.05	0.58±0.07	0.33±0.19
σ^b	0.0192	0.0192	0.0191

(a) valores donde el error es superior al propio valor.

(b) $\sigma = (\sum (\text{velocidad experimental} - \text{velocidad teorica})^2 / (\text{número de datos} - n))^{1/2}$. Donde n es igual a 6 para la ecuación (2), 7 cuando se le añade K_b y 8 cuando se le adiciona B y K_b .



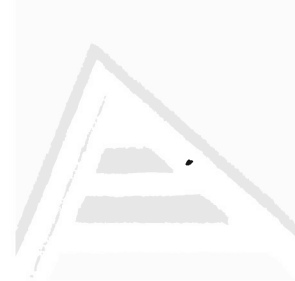
Estudios de inhibición por producto.

En los estudios de inhibición por producto, ver Tabla M.9 y Figura M.9, los datos obtenidos no se ajustaron a los patrones de inhibición por producto reflejados en la Tabla M.1, hecho esperable debido a que según el estudio de velocidades iniciales existiría una etapa de equilibrio rápido, modificándose por tanto las reglas de pendientes y ordenadas para estos sistemas. A continuación se cita la modificación utilizada por tratarse de sistemas de estado estacionario con etapas de equilibrio rápido (Segel, 1975; Engel et al., 1975):

Un producto no actuará como inhibidor si debe combinarse con una forma del enzima que es parte de un segmento de equilibrio rápido a menos que compita directamente con un sustrato o forme un complejo dead-end junto con uno de los otros sustratos.

A la vista de esta regla general resulta comprensible que el L-glutamato produjera un patrón competitivo frente al 2-oxo-glutarato, confirmando esto la etapa de equilibrio rápido $E-NADPH \rightleftharpoons E-NADPH-KG$. Esto supone que el L-glu y el 2-KG compiten por el sitio de unión siendo mutuamente exclusivos dando lugar a la formación de un complejo dead-end (E-NADPH-L-glu). La inhibición esperada con los otros sustratos sería no competitiva.

El NADP presentó inhibición competitiva frente al NADPH y no competitiva frente al 2-KG. La inhibición esperada frente al KG sería no competitiva o mixta si la unión de NADP y KG no son mutuamente excluyentes y el NADP puede adicionarse antes que el KG, lo que confirmaría que el primer sustrato en unirse al enzima libre es el NADPH.



T A B L A M.9

Constantes cinéticas y de inhibición aparentes para la glutamato deshidrogenasa NADP- dependiente de *Haloferax mediterranei*, determinadas a partir de los datos de inhibición por producto. Los cálculos de las constantes se realizaron mediante programas FORTRAN descritos por Cleland (1979) y modificados para IBM-PC.

Sustrato variable	$K_M \pm S.E.$	Producto Inhibidor	$K_i \pm S.E.$	$K_{ii} \pm S.E.$	σ	Patrón	Sustrato fijo
NADPH	0.017±0.002	NADP*	0.012±0.001		0.02	C	KG = 10 mM NH ₄ ⁺ = 35 mM
NADPH	0.012±0.001	L-glu	14±5	40±11	0.02	NC	KG = 10 mM NH ₄ ⁺ = 35 mM
amonio	1.13±0.11	L-glu	29±10	88±24	0.02	NC	NADPH = 0.05 mM KG = 100 mM
α-KG	0.42±0.09	L-glu	3.0 ± 0.7		0.03	C	NADPH = 0.05 mM NH ₄ ⁺ = 35 mM

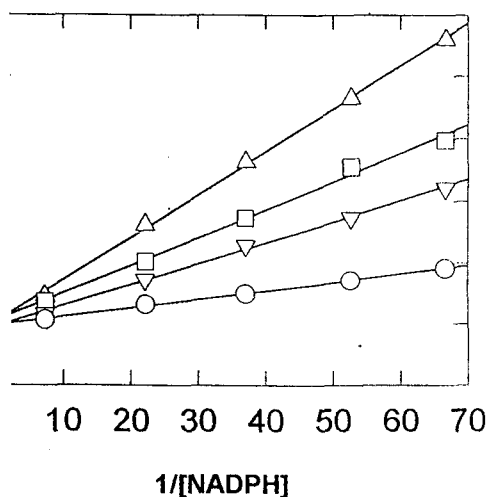


Figura M.9a: Inhibición por NADP con NADPH como sustrato variable. Las concentraciones de L-glutamato fueron las siguientes: \circ 0 mM, \square 0.025 mM y \triangle 0.050 mM.

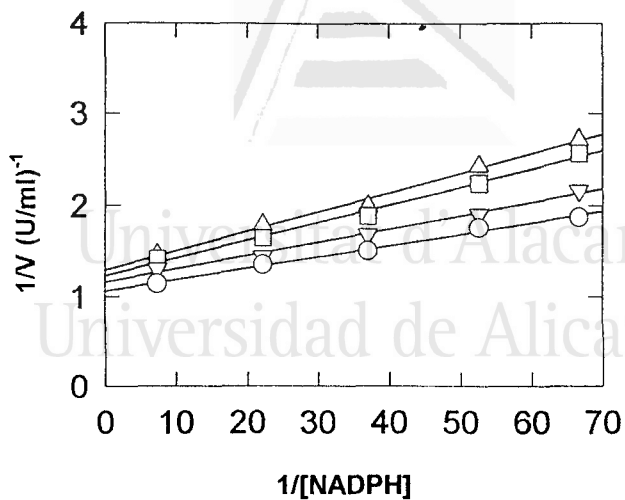


Figura M.9b: Inhibición por L-glu con NADPH como sustrato variable. Las concentraciones de L-glutamato fueron \circ 0 mM, ∇ 2 mM, \square 5 mM y \triangle 10 mM.

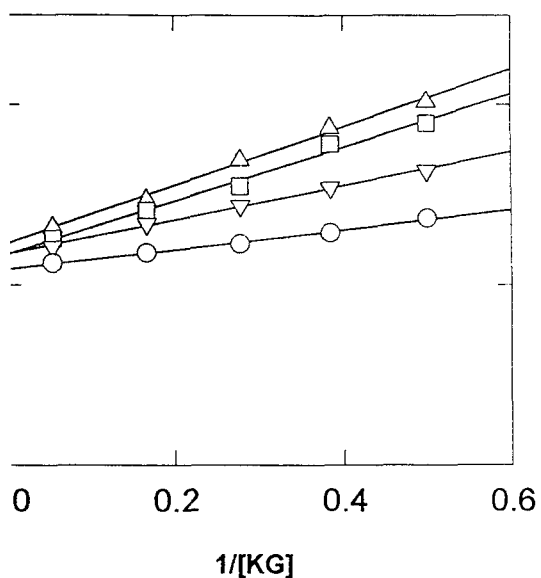


Figura M.9c: Inhibición por L-glu con 2-oxoglutarato como sustrato variable. Las concentraciones de L-glutamato fueron \circ 0 mM, ∇ 2 mM, \square 5 mM y \triangle 10 mM.

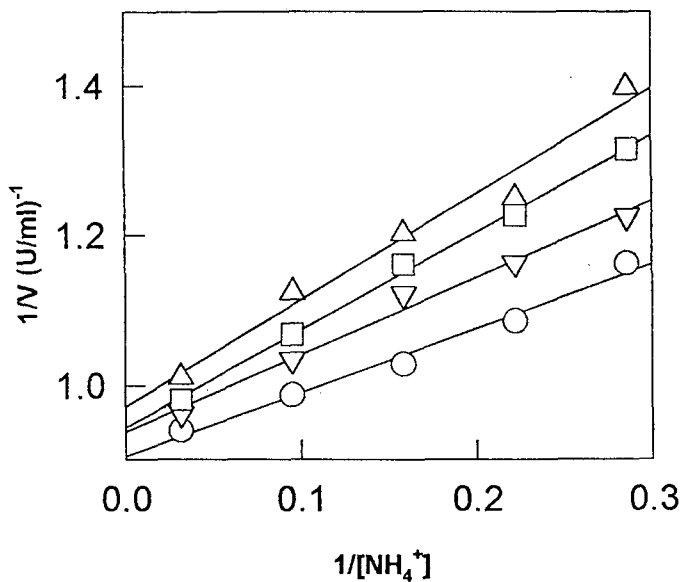


Figura M.9d: Inhibición por L-glu con amonio como sustrato variable. Las concentraciones de L-glutamato fueron \circ 0 mM, ∇ 2 mM, \square 5 mM y \triangle 10 mM.



Estudios de Inhibición por análogos de sustratos.

Varios autores han demostrado que la hidroxilamina y el glutarato son inhibidores competitivos de las glutamato deshidrogenasas. Para la GDH de *Hf. mediterranei* se realizaron estudios utilizando estos compuestos como inhibidores, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla M.10. El glutarato es competitivo frente a 2-oxoglutarato (Figura M.10a), acompetitivo frente NADPH (Figura M.10b) y no competitivo frente al amonio (Figura M10c). La hidroxilamina es competitivo frente al amonio (Figura 10d) y no competitivo frente a 2-oxoglutarato (Figura M.10e). Estos patrones no se ajustan completamente a los señalados en la Tabla M.2, pues existe una etapa de equilibrio rápido. Las reglas que se aplicaron para predecir los patrones de inhibición fueron las siguientes (Segel, 1975):

Un compuesto (I) actuará como un inhibidor competitivo con respecto al sustrato variable (S) sólo si I y S son mutuamente excluyentes, o I y S compiten por la misma forma, o I se añade antes que S en una secuencia de reacción ordenada para producir una forma de enzima que no se une a S.

I actuará como acompetitivo con respecto a S sólo si S debe añadirse antes que I en una secuencia ordenada. I y S se combinan con diferentes formas de E y no son mutuamente excluyentes.

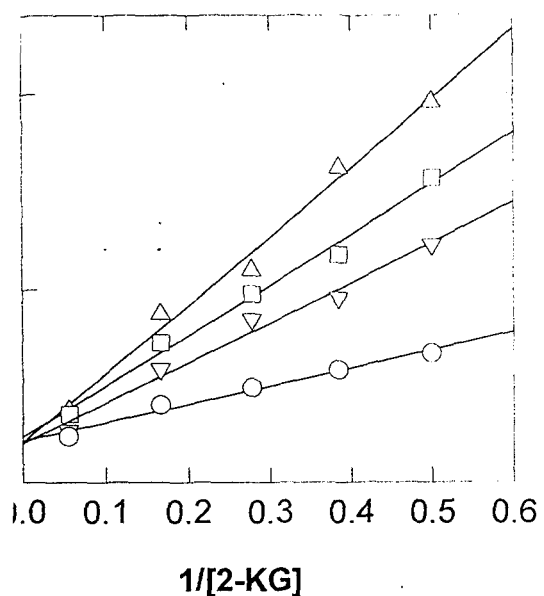
I actuará como no competitivo o mixto con respecto a S si I y S no son mutuamente excluyentes e I puede adicionarse antes que S. I y S pueden combinarse con la misma o diferentes formas del enzima. I será no competitivo o mixto si promueve la unión de S, imitando a un sustrato que se adiciona antes que S en una secuencia ordenada.

Constantes de inhibición para la reacción de aminación reductiva catalizada por glutamato deshidrogenasa NADP⁺- dependiente de *Haloferax mediterranei* con glutarato e hidroxilamina como inhibidores. Las condiciones experimentales se detallan en la tabla M.7. Las constantes fueron calculadas mediante programas FORTRAN descritos por Cleland (1979) y modificados para IBM-PC. Las constantes están expresadas en mM.

Sustrato Variable	$K_M \pm S.E.$	Inhibidor competitivo sustrato	$K_{ij} \pm S.E.$	σ	Patrón
α -KG	0.53 \pm 0.06	Glutarato (fig.M10a)	17 \pm 3	0.0213	C ^a /C ^b
NADPH	0.013 \pm 0.001	Glutarato (fig.M10b)	137 \pm 14	0.0173	U ^a /U ^b
Amonio	2.2 \pm 0.3	Glutarato(fig.M10c)	4.3 \pm 1.8	0.072	NC ^a /NC ^b
Amonio ^c	2.8 \pm 0.2	Hidroxilamina (fig. M10d)	Kis1= 3.8 \pm 0.7 Kis2= 16 \pm 3	0.013	C ^a /C ^b
α -KG	0.45 \pm 0.06	Hidroxilamina (fig.M10e)	7 \pm 2	0.0113	NC ^a /NC ^b

Patrones de inhibición por análogos de sustratos ^aobservados y ^besperados (con respecto Tabla M.11).

(c) Ajuste de la inhibición a la ecuación: $v = V_{max} * [A] / (K_M (1 + [I] / (Kis1 + [I]^2 / (Kis2) + [A])))$ Inhibición competitiva parabólica.



M.10a: Inhibición por glutarato siendo el sustrato 2-oxoglutarato. A las concentraciones de ∇ 10 mM, \square 20 mM y \triangle 40 mM.

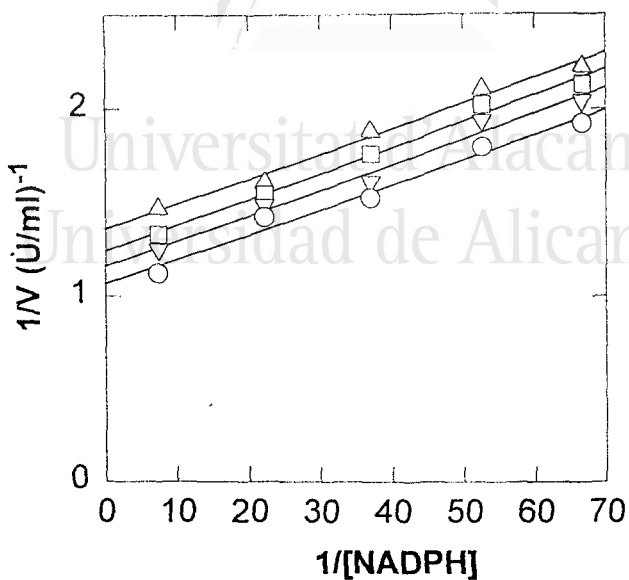


Figura M.10b: Inhibición por glutarato siendo NAD el sustrato variable a las concentraciones de glutarato: \circ 0 mM, ∇ 10 mM, \square 20 mM y \triangle 40 mM.

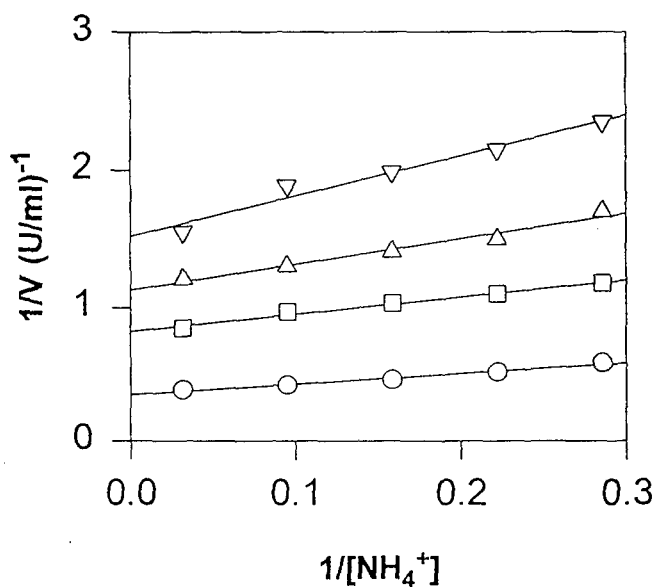
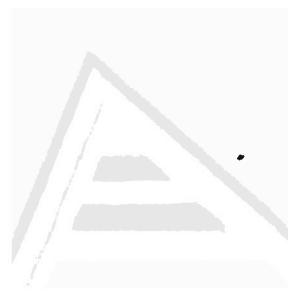


Figura M.10c: Inhibición por glutarato siendo amonio el sustrato variable. A las concentraciones de glutarato \circ 0 mM, ∇ 7 mM, \square 8 mM y \triangle 9 mM.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

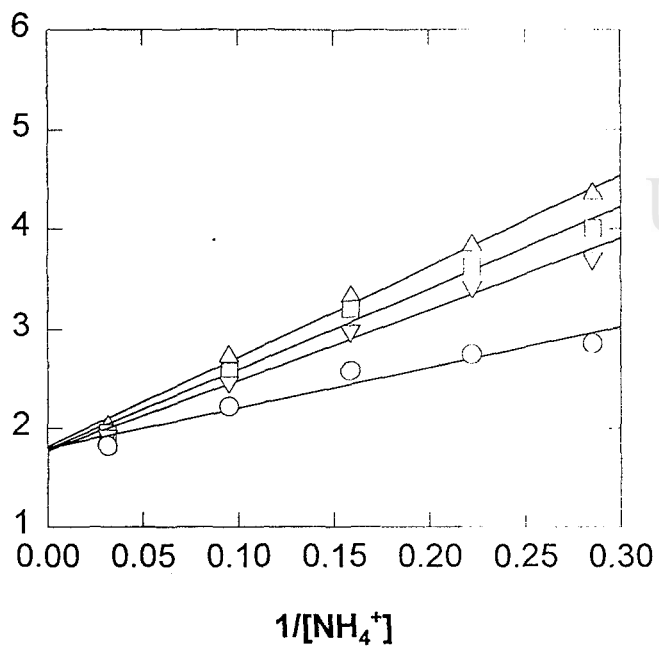


Figura 10d: Inhibición por hidroxilamina siendo amonio el sustrato variable. A las concentraciones \circ 0 mM, ∇ 2 mM, \square 5 mM y \triangle 10 mM.

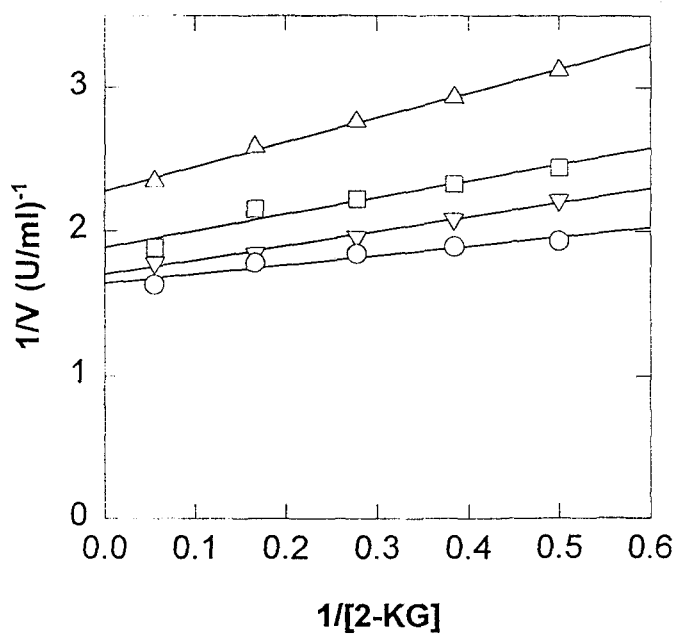


Figura 10e: Inhibición por hidroxilamina siendo 2-KG el sustrato variable. A las concentraciones \circ 0 mM, ∇ 2 mM, \square 5 mM y \triangle 10 mM.

El glutarato presentó una inhibición competitiva frente a KG y acompetitiva frente a NADPH, según la regla 2 el NADPH debe unirse antes que el glutarato, uniéndose el NADPH y el glutarato a diferentes formas del enzima, como se refleja en la Figura M.12. Además el glutarato muestra una inhibición no competitiva o mixta frente a amonio, lo que implicaría que la unión de glutarato y amonio no son mutuamente excluyentes, y el glutarato se adicionaría antes que el amonio imitando así a un sustrato que se añadiese antes que el amonio. El patrón de inhibición del glutarato se ajustaría al mostrado por el inhibidor V en la figura M.11 y la Tabla M.11.

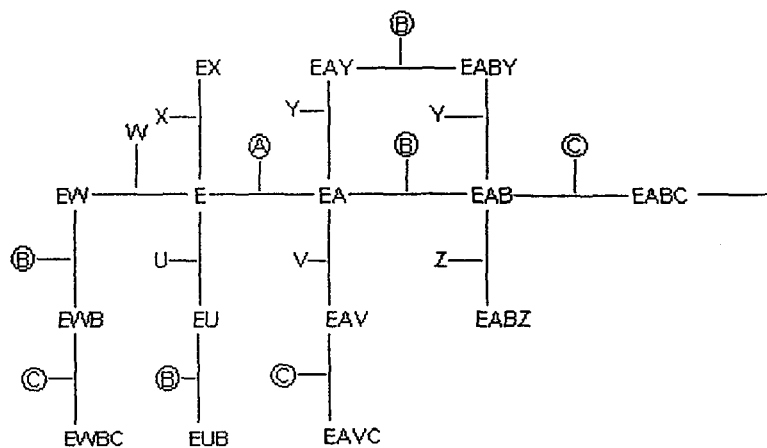


Figura M.11: Patrones de inhibición en un sistema ordenado terreactante con etapas en equilibrio rápido. A, B y C representan los tres sustratos. U-Z representan los inhibidores.



Tabla M.11: Patrones de Inhibición para un sistema ordenado con etapas de equilibrio rápido.

Inhibidor	Inhibición relativa al variar el sustrato		
	A	B	C
U	C	MT	C
V	UC	C	MT
W	C	MT	MT
X	C	C	C
Y	UC	MT	C
Z	UC	UC	C

La hidroxilamina presentó un patrón de inhibición igual al mostrado por el inhibidor Y en la Figura M.11 y Tabla M.11. Sería no competitiva frente al 2-KG, según la regla 3 la hidroxilamina puede unirse a formas diferentes del enzima, hecho ratificado debido a que la representación secundaria de pendientes es parabólica. Los distintos complejos dead-end que se formarían se describen en la Figura M.12.

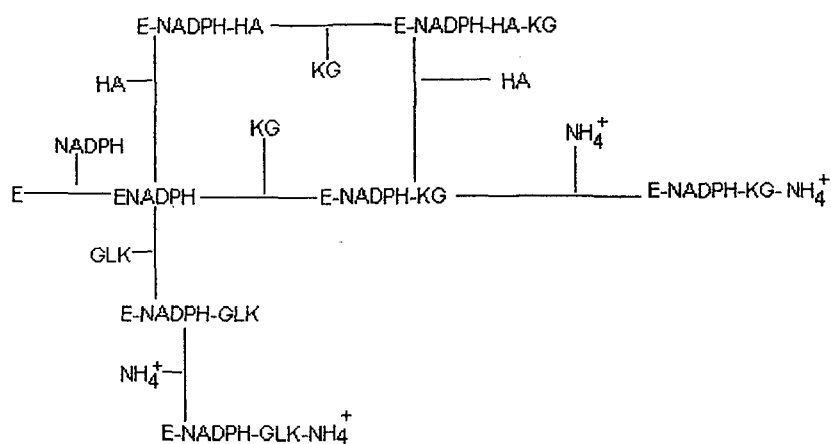
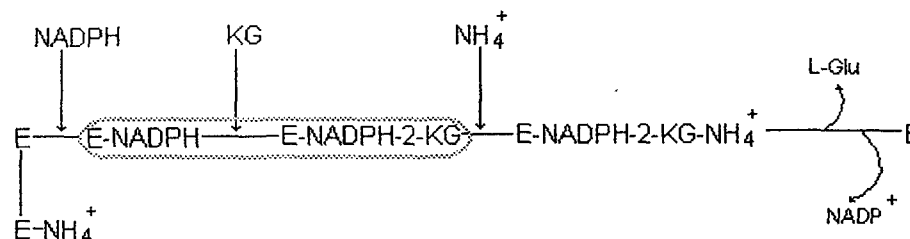


Figura M.12: Esquema de actuación de GDH con sus inhibidores GLK=glutarato, HA=hidroxilamina.

A la vista de estos resultados, se puede proponer que el mecanismo mostrado por la glutamato deshidrogenasa NADP⁺-dependiente de *Haloferax mediterranei* en la reacción de aminación reductiva y en ausencia de sal, es un mecanismo ordenado con una etapa de equilibrio rápido en la unión de 2-oxoglutarato. La adición de NADPH y amonio se realizan en estado estacionario.



Hay que tener en cuenta que un sistema ordenado de equilibrio rápido es un caso límite de un mecanismo más realista de estado estacionario. Sin embargo, es posible su conversión a equilibrio rápido en determinadas condiciones, tal como describe Rife et al., (1975) para glutamato deshidrogenasa, usando sustratos alternativos como el α -cetovalerato, o por cambio del pH como ocurre con el enzima málico (Schimerlik et al., 1977). Para glutamato deshidrogenasa de *Hf. mediterranei* la ausencia de sal puede reflejar unas condiciones límites que hacen que presente etapas de equilibrio rápido, cuando en condiciones óptimas estas etapas serían de estado estacionario.

4.5 ESTUDIOS DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS IONES HIDROGENO (pH) EN EL ENZIMA.

4.5.1 Introducción.

Normalmente los centros activos de los enzimas poseen grupos ionizables que se supone están en la forma iónica más apropiada tanto para mantener la conformación del centro activo, como para unir a los sustratos y catalizar la reacción; por tanto, es razonable pensar que el pH influya en la velocidad de la reacción catalizada por el enzima. No sólo el enzima se puede ver afectado sino que uno o más sustratos pueden contener grupos ionizables y sólo puede interaccionar con el enzima una determinada forma iónica de dichos sustratos (Segel, 1975).

El tratamiento de los efectos de la concentración del ión hidrógeno sobre el enzima de la misma forma que otros efectores, puede dar una información valiosa sobre la naturaleza de los grupos implicados en el mecanismo químico (catalítico) del enzima. Además, las constantes de ionización características de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de la proteína hacen que estos estudios sirvan para identificar grupos específicos que desempeñan un papel importante en la catálisis. Esta última aproximación es frecuentemente contemplada como la función más destacada de estos estudios de pH (Tipton y Dixon, 1979).

Los valores de pK de los grupos prototrópicos del centro activo se suelen determinar mediante las representaciones de Dixon, midiendo la dependencia de las variables cinéticas aparentes V_{\max}/K_M y V_{\max} con el pH (Segel, 1975). Mientras que las medidas de velocidad a concentraciones elevadas de sustrato dan los pKs de los complejos ES, las medidas a concentraciones de sustrato muy bajas pueden dar los pKs del enzima libre y el sustrato (Dixon y Webb, 1979). Los valores de pK obtenidos pueden no ser verdaderos valores, ya que los pK de estos grupos pueden verse

afectados por el ambiente en que se encuentre el enzima (un ambiente acuoso o hidrofóbico), así como por la proximidad de otros grupos cargados que también pueden afectar al pK, una carga positiva lo disminuye y una negativa lo incrementa (Tipton y Dixon, 1979).

Muchas veces, la sensibilidad del enzima con el pH es una indicación de la existencia de un grupo ionizable en su centro activo, pero puede también ser fruto de algún cambio en la estructura terciaria del enzima que afecte al centro activo; por ello el efecto del pH en la actividad enzimática debe interpretarse con precaución, incluso en el sistema más sencillo los valores de pK obtenidos son constantes moleculares relativamente complejas (Tipton y Dixon, 1979).

4.5.2 Metodología.

Se analizó el efecto del pH en los parámetros cinéticos de la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente de *Hf.mediterranei* en la dirección de aminación reductiva y en ausencia de sal. Para ello, se prepararon tampones con un escala de pHs comprendida entre 6.5 y 10.0, a una concentración de 10 mM y conteniendo EDTA 2 mM. Se utilizó fosfato sódico en el rango de pH 6.5 a 7.5 inclusive, Tris-HCl de 7.5 a 9.0 y tampón glicina-NaOH en el rango 9.0 a 10.0. La determinación de las actividades a cada pH se efectuó variando la concentración de cada uno de los sustratos y manteniendo fijos los otros dos; las concentraciones fueron: cuando NADPH fue el sustrato variable, el 2-oxoglutarato se mantuvo a una concentración de 100 mM y el amonio a 0.2 M en la cubeta de reacción, cuando 2-oxoglutarato era el sustrato variable, el NADPH fue 0.2 mM y el amonio 0.2 M y cuando amonio fue el sustrato variable, el 2-oxoglutarato fue 100 mM y el NADPH 0.2 mM.

En el tratamiento de los datos, las inversas de velocidades iniciales se representaron frente las inversas de las concentraciones de sustrato, y

los datos experimentales se ajustaron a la ecuación (1) mediante el programa HYPER de Cleland (1979), modificado a FORTRAN 77 en este Departamento por la Dra. Bonete para su uso en PC. Se obtuvieron los valores de V_{max} , K_M , y V/K con sus errores estándar (Tablas pH.1, pH.2 y pH.3) para cada uno de los sustratos, NADPH, 2-oxoglutarato y amonio respectivamente. Dichos parámetros cinéticos (V y V/K) se representaron frente al pH, ajustando estos puntos a las ecuaciones (2), (3) ó (4) según la forma de la curva obtenida; estos ajustes se realizaron mediante los programas BELL, HABELL y HBBELL, suministrados por Cleland (1979) e igualmente modificados a FORTRAN 77.

$$v = \frac{V \cdot A}{K + A} \quad (1)$$

$$\text{Log } y = \text{Log} \left(\frac{c}{1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H}} \right) \quad (2)$$

$$\text{Log } y = \text{Log} \left(\frac{c}{1 + \frac{H}{K_1}} \right) \quad (3)$$

$$\text{Log } y = \text{Log} \left(\frac{c}{1 + \frac{K_2}{H}} \right) \quad (4)$$

En estas ecuaciones "y" representa V ó V/K y "H" es la concentración del ión hidrógeno, "c" es el valor de "y" pH-independiente en un estado óptimo de protonación, K_1 , K_2 , son las constantes de disociación de los grupos que participan en la catálisis y pueden estar desprotonados

o no, respectivamente. Se elige el mejor ajuste de los datos en base al error estándar de los parámetros fijados y al valor más bajo de σ (suma de los cuadrados de los residuales dividido por los grados de libertad).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

TABLA pH.1.

Valores de K_M , V_{max} y V/K , para el sustrato NADPH a diferentes pHs. En la reacción de aminación reductiva de la NADP-GDH de *Hf. mediterranei*.

pH	V_{max}	K_M	V/K	σ
6.5	0.71±0.04	0.013±0.002	52 ± 8	0.029
7.0	0.94±0.09	0.023±0.006	41 ± 8	0.059
7.5	1.03±0.06	0.016±0.003	65 ± 8	0.039
8.0	1.05±0.08	0.013±0.003	81 ± 16	0.058
8.5	1.21±0.04	0.018±0.002	67 ± 5	0.030
9.0	1.18±0.05	0.017±0.002	71 ± 6	0.032
9.5	0.87±0.05	0.012±0.002	71 ± 10	0.035
10.0	0.83±0.05	0.014±0.003	58 ± 9	0.038

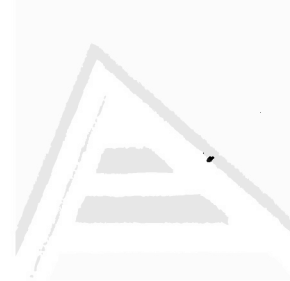


Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

TABLA pH.2

Valores de K_M , $V_{m\acute{a}x}$, y V/K , para el sustrato 2-oxoglutarato a diferentes pHs. En la reacci3n de aminaci3n reductiva de la NADP-GDH de *Hf. mediterranei*.

pH	$V_{m\acute{a}x}$	K_M	V/K	σ
6.5	1.48±0.06	0.11±0.02	13±2	0.056
7.0	1.66±0.05	0.11±0.02	15±2	0.048
7.5	2.34±0.07	0.20±0.02	12±0.9	0.047
8.0	2.80±0.12	0.22±0.03	13±1	0.073
8.5	4.1±0.2	0.34±0.04	12±1	0.067
9.0	3.8±0.3	0.30±0.06	12±2	0.110
9.5	2.69±0.11	0.23±0.03	12±1	0.062
10.0	2.5±0.2	0.20±0.05	12±2	0.123



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

TABLA pH.3.:

Valores de K_M , $V_{m\acute{a}x.}$ y V/K , para el sustrato Amonio a diferentes pHs.
 En la reacci3n de aminaci3n reductiva de la NADP-GDH de
Hf.mediterranei.

pH	$V_{m\acute{a}x.}$	K_M	V/K	σ
6.5	0.404±0.002	5.63±0.08	0.075±0.001	0.001
7.0	0.64±0.02	6.19±0.57	0.103±0.006	0.013
7.5	0.92±0.06	4.8±0.9	0.19±0.03	0.04
8.0	1.12±0.04	3.4±0.4	0.33±0.03	0.031
8.5	1.51±0.09	4.1±0.8	0.37±0.05	0.067
9.0	1.36±0.05	3.6±0.4	0.38±0.03	0.037
9.5	1.28±0.04	3.4±0.4	0.37±0.03	0.031
10.0	1.22±0.06	3.5±0.6	0.35±0.04	0.044



4.5.3 Resultados y discusión.

En la Tabla pH.1 se observa que el NADPH muestra una afinidad muy similar en todos los pHs ensayados, y su mayor velocidad máxima se obtiene a pH 8.5; la máxima afinidad del 2-oxoglutarato da a pH 6.5 y su velocidad máxima a 8.5 (Tabla pH.2); el amonio también alcanza su mayor velocidad a pH 8.5 y muestra una mayor afinidad a pH 8. Según Cleland (1981), en un mecanismo en el que la unión del sustrato sólo ocurre en la forma correctamente protonada del enzima, el perfil de V será independiente del pH, y los valores de pK para los grupos catalíticos y de unión se obtendrán de las representaciones de V/K . Al realizar las representaciones de Dixon para los tres sustratos de la aminación reductiva se aprecia una dependencia de la velocidad máxima con el pH (Figura pH.1). Dada la forma de la curva, tanto en el caso del NADPH como en el 2-oxoglutarato debe utilizarse la ecuación 2 descrita en la metodología; en el caso del amonio se aplicó la ecuación 3 ya que muestra una disminución a bajos pH.

El perfil de $\log V/K$ (Figura pH.2) para el NADPH muestra que la unión de este sustrato al enzima es dependiente de dos pKs (Tabla pH.4). Aunque en la práctica es muy difícil relacionar los pKs determinados experimentalmente con un residuo de aminoácido particular en la molécula de enzima, parece probable que en la unión del NADPH intervenga un grupo imidazólico no protonado de histidina y un grupo ϵ -amino de lisina, el primero se ha reseñado en la NAD-GDH de *H.halobium* (Camacho et al. 1993) y recientemente, se ha descrito el papel de aminoácidos básicos en la unión del coenzima NADP(H) en varios enzimas. Estos residuos básicos interaccionan con el grupo 2'-fosfato del coenzima, como se ha observado mediante estudios de mutagénesis dirigida que implican al residuo básico lisina-286, residuo muy conservado entre las glutamato deshidrogenasas de distintas especies (Haeffner-Gormley et al., 1992).

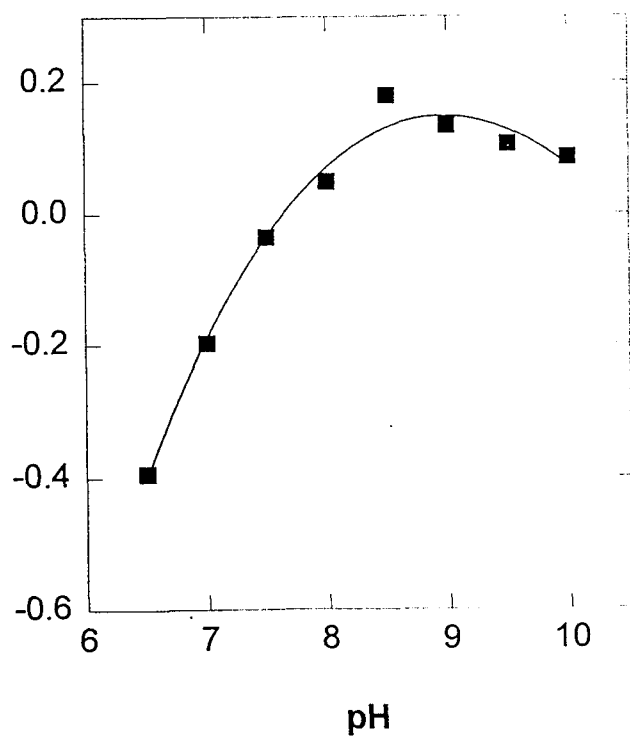
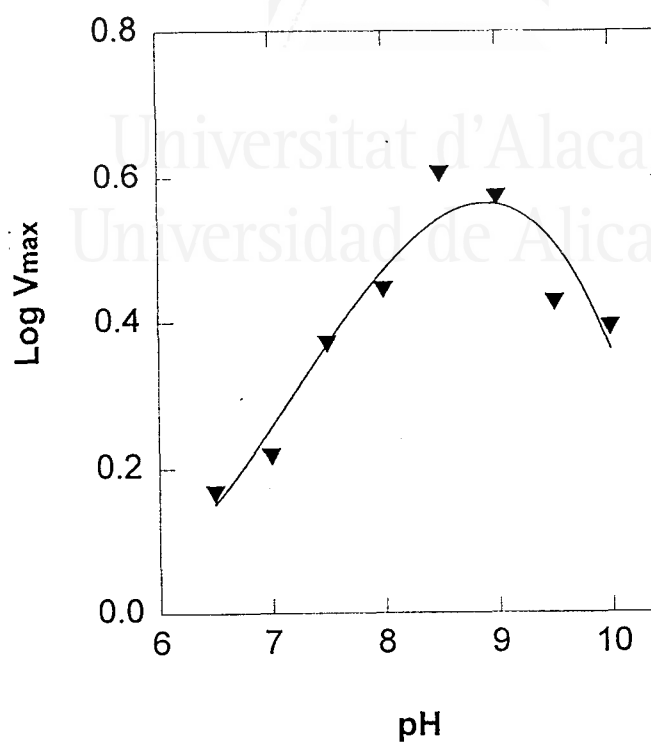
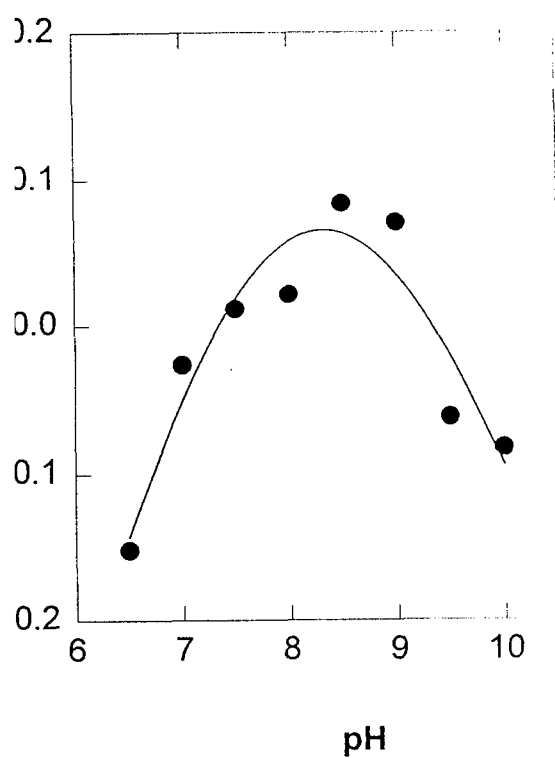


Figura pH.1:
Dependencia del Log Vmax con el pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NADP-glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*, en condiciones estándar de medida.

- Sustrato variable NADPH.
- ▼ Sustrato variable 2-oxoglutar
- Sustrato variable amonio.

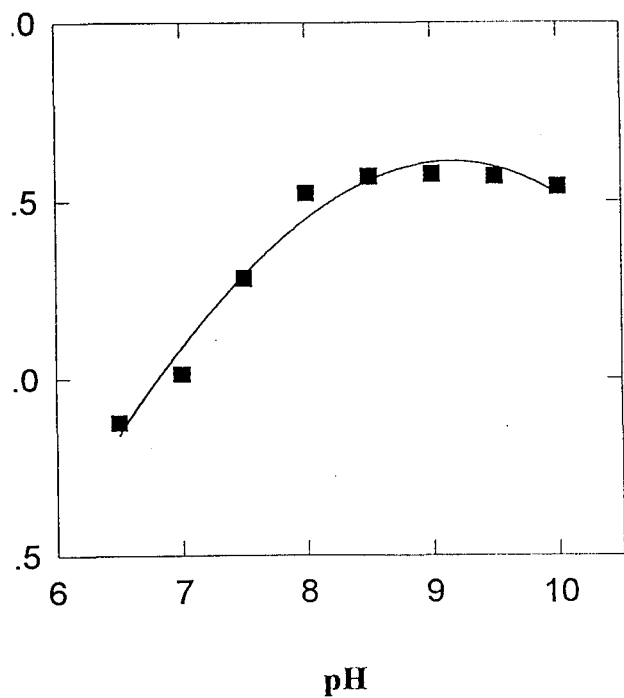
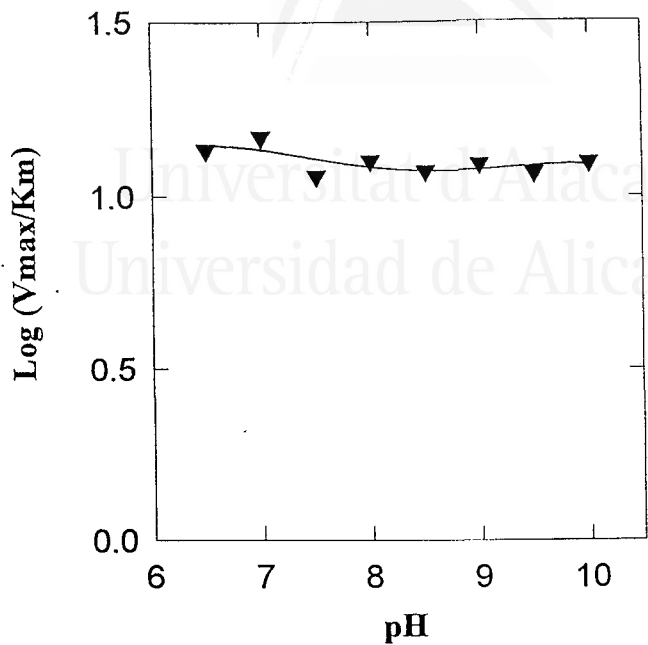
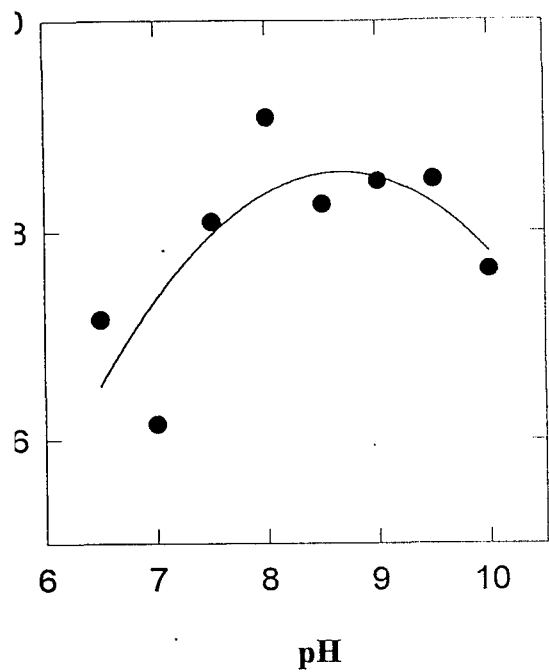


Figura PH.2:
Perfil de Log (V_{máx}/K_m) frente al pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por la NADP-GDH de *Hf.mediterranei* en condiciones estándar de medida.

- Sustrato variable NADPH.
- ▼ Sustrato variable 2-oxoglutarato.
- Sustrato variable amonio.

TABLA pH.4

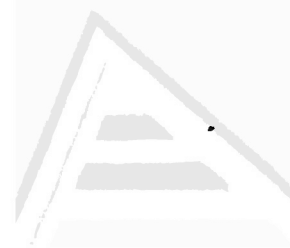
Valores de pK de los parámetros cinéticos para glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente de *Hf.mediterranei* en la reacción de aminación. Estos valores se han calculado mediante el ajuste a las ecuaciones adecuadas que figuran en la metodología de este apartado.

Parámetro	pK ₁	pK ₂	σ	ecuación ajuste
Log V _{NADPH}	6.29±0.12	10.4±0.2	0.089	(2)
Log V/K _{NADPH}	6.2±0.3	10.8±0.7	0.196	(2)
Log V _{α-KG}	6.8±0.2	10.3±0.3	0.068	(2)
Log V/K _{α-KG}	—	11.3±0.9	0.090	(4)
Log V _{amónio}	6.85±0.04	—	0.029	(3)
Log V/K _{amónio}	7.2±0.09	—	0.184	(3)

El perfil de V/K correspondiente a 2-oxoglutarato disminuye a altos pHs, obteniéndose un pK de 11.3±0.9 con pendiente negativa, lo que significa que requiere un grupo protonado para que la reacción se produzca. Este hecho también se ha descrito en la GDH bovina donde se encontró un grupo protonado relacionado con la unión del 2-oxoglutarato, atribuyéndolo a un ε-amino de un residuo de lisina. Es probable que en la unión del 2-oxoglutarato esté implicado un grupo ε-amino protonado de lisina, o bien, un grupo hidroxilo fenólico de tirosina, o un grupo guanidinio de arginina; elementos también descritos en la glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* (Camacho et al. 1993). Se ha demostrado que la GDH bovina posee dos lisinas reactivas, los residuos 126 y 27 (Rife y Cleland 1980). Una de ellas se une al C-5 del 2-oxoglutarato o del glutamato, y la otra actúa como catalizador ácido-base, donando un protón al oxígeno del

grupo carbonilo del 2-oxoglutarato durante la adición de amonio, que reacciona como NH_3 para formar carbinolamina. Estos autores han comentado el hecho de que los grupos mostrados en los perfiles de V/K para los cetoácidos tienen pKs diferentes a los perfiles de V/K para los aminoácidos. Así, la lisina que se une al 5-carboxilo de los sustratos dicarboxílicos tiene un pK de 7.9 en E-NADPH, y de 8.7-9.3 en E-NADP⁺; y la lisina que actúa como un catalizador ácido-base tiene un pK de 7.6-8.0 en E-NADP⁺, pero un pK superior a 10 en E-NADPH. Pudiendo ser que en nuestro caso, el residuo correspondiente actúe como catalizador ácido-base, ya que el pK obtenido es superior a diez.

El perfil de V/K para el amonio muestra un descenso a pH bajos, pero no a pH altos. El pK obtenido es de 7.22 ± 0.09 correspondiendo, con las limitaciones anteriormente citadas, a un grupo $\alpha\text{-NH}_2$ de un aminoácido terminal donde se uniría el amonio. En alanina deshidrogenasa de *Soybean Nodule Bacteroids* (Smith y Emerich, 1993) el perfil de V/K para el amonio muestra un descenso a pH altos, además del descenso a pH bajos, presentando un pK en la parte básica de la curva de 9.0 muy próximo al pK para el amonio ($\text{pK}_a=9.2$), concluyendo que el descenso después del pK del amonio implica que el enzima une al mismo en la forma NH_4^+ más que en la forma NH_3 . Esto nos podría llevar a pensar que la NADP-GDH de *Hf.mediterranei* une al amonio en la forma NH_3 , hecho descrito en la glutamato deshidrogenasa bovina (Rife y Cleland, 1980).



4.6 PROPIEDADES MOLECULARES.

4.6.1 Peso Molecular.

4.6.1.1 Introducción.

Entre las glutamato deshidrogenasas aisladas de distintas fuentes se podrían distinguir, desde un punto de vista estructural, dos grupos dependiendo del coenzima utilizado. Así las GDH que utilizan exclusivamente NAD formarían un grupo cuya estructura estaría constituida por cuatro subunidades iguales (tetraméricas), mientras que las que utilizan NADP o ambos coenzimas la proteína suele estar formada por seis subunidades idénticas (hexaméricas). En la Tabla PM.1 se muestran los valores de los pesos moleculares así como el número de subunidades y el coenzima que utilizan. Las NADP-dependientes suelen ser hexámeros, independientemente del Dominio al cual pertenezcan, Archaea, Eucarya o Bacteria, habiéndose descrito alguna NADP-dependiente no hexamérica.

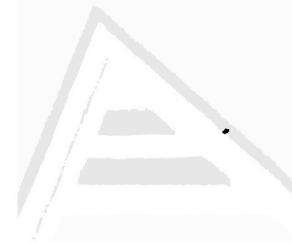
Como se puede observar en la Tabla, el peso molecular descrito para las glutamato deshidrogenasas oscila entre 180,000 y 480,000 Da., siendo las NAD-dependientes las de mayor y menor rango de peso molecular, así es el caso de *Neurospora crassa* cuyo peso molecular es de 460,000 Da. o de *Achlya klebsiana* (un oomiceto) 480,000 Da., pero compuestas de 4 subunidades de elevado peso molecular de 115,000 y 120,000 Da. respectivamente. Las GDHs de menor rango son también NAD-específicas cuyos valores oscilan entre 180,000 y 270,000 Da., con un peso molecular de subunidad entre 45,000 y 55,000 Da. Con una masa molecular intermedia (desde 270,000 a 400,000 Da.) estarían las NADP-específicas y aquellas que utilizan ambos coenzimas, y con un peso molecular de subunidad entre 45,000 y 60,000 Da., formadas a su vez por 6 subunidades.

TABLA PM.1
 Pesos moleculares de glutamato deshidrogenasa de diversas fuentes, coenzimas que usan y número de subunidades que las componen. El peso molecular está expresado en Daltons.

Fuente	Coenzima	Subunidades	Peso Molecular
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> (Hornby y Engel, 1984)	^a NAD	5 ó 6	49.000
<i>Halobacterium halobium</i> (Bonete et al., 1987)	NADP	N.D. ^d	N.D. ^d
<i>Halobacterium marismortui</i> (Leicht et al., 1978)	NADP	4	53.000
<i>Chlorella sorokiniana</i> (Gronostajski et al., 1978)	^b NADP	5 a 7	58.000
<i>Chlorella sorokiniana</i> (Gronostajski et al., 1978)	NAD	4	45.000
<i>Sulfobolus solfataricus</i> (Maras et al., 1992)	NAD(P)	6	46.000
<i>Laccaria laccata</i> (Brun et al., 1992)	NADP	6	47.000
ES4 Hypertermofilo arqueobacteria (DiRuggiero et al., 1993)	NADP	6	46.000
<i>Thermococcus litoralis</i> (Ma et al., 1994)	NADP	6	45.000
<i>Pyrococcus furiosus</i> (Consalvi et al., 1991)	NAD(P)	6	48.000
<i>Escherichia coli</i> (Lin y Reeves, 1991)	NADP	6	44.500
<i>Dictyostelium discoideum</i> (Pamula y Wheadrake, 1991)	^c NAD	6	54.000
<i>Achlya klebsiana</i> (Yang y Léjohn, 1994)	NAD	4	120.000
<i>Clostridium symbiosum</i> (Syed, 1987)	NAD	6	48.000

Fuentes	Coenzima	Subunidades	Peso Molecular
Higado bovino (Eisenberg y Tomkins, 1968)	NAD(P)	6	53.000
<i>Methylobacillus flagellatum</i> (Kiriukhin et al., 1992)	NADP	6	47.000
<i>Ankistrodesmus braunii</i> (Sofin et al., 1984)	NAD(P)	6	51.900
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Sathilov et al., 1977)	NAD(P)	6	49.000
Higado de anguila (Tang et al., 1992)	NAD(P)	6	56.000
			340.000

- (a) Este enzima principalmente utiliza NAD como coenzima, pero también puede utilizar NADP, viéndose reducida la velocidad de la reacción a un 4% de la obtenida cuando se utiliza NAD.
- (b) El peso molecular descrito para este enzima difiere según el método utilizado para su cálculo, cuando se utilizó cromatografía de tamizado molecular, Sephadex G-200, el peso molecular aparente obtenido fue de 400,000 Da., mediante equilibrio de sedimentación se estimó en 290,000 Da., y por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa en 270,000 Da.
- (c) En *Dictyostelium discoideum* se han descrito dos GDH mitocondriales, una NAD y otra NADP específica, y otra extramitocondrial que es NAD específica, que puede utilizar NADPH en vez de NADH en el sentido de aminación del 2-KG; siendo esta última la aquí referida.
- (d) N.D.: no determinada.



4.6.1.2 Metodología.

El método utilizado para la estimación del peso molecular del enzima nativo, fue filtración en gel (Sephacosa CL-6B). Se realizaron dos tipos de ensayos uno con NaCl 1M, o con KCl 1M, y otro en ausencia de sal pero se sustituyó ésta por glicerol al 20%. El cálculo del peso molecular en condiciones de ausencia de sal se realizó para comprobar que la calibración de la columna no presentaba variaciones significativas por la presencia de sal. Por otro lado, la ausencia de sal produciría una inactivación del enzima que no nos permitiría detectarla específicamente. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de estabilidad de la NADP-GDH halofílica en cuanto a la sustitución de la sal por el glicerol 20% (v/v), se utilizó éste para realizar el calibrado de la columna en ausencia de sal. Debido a que el catión intracelular mayoritario es el K^+ es de esperar que en presencia de éste el enzima presente la estructura cuaternaria que posee en la célula. Aitken y Brown (1972), comprobaron que la Isocitrato deshidrogenasa de *Halobacterium salinarium*, mostraba un peso molecular aparente de 70,800 Da. cuando los experimentos de filtración en gel se realizaban a bajas concentraciones salinas; en las concentraciones fisiológicas de K^+ el enzima aparecía como un dímero con un peso molecular aparente entre 122,000 y 135,000 Da., y en concentraciones de NaCl de 1 a 4 M, aparecía como un trímero o un tetrámero (224,000 a 251,000 Da).

Los tampones utilizados para la NADP-GDH halofílica fueron: tampón Tris-HCl 10 mM, (pH=8.0) conteniendo EDTA 1 mM y $MgCl_2$ 10 mM; para la determinación en presencia de sal, en un caso se usó NaCl 1 M y en el otro KCl 1 M, en ausencia de sal se sustituyó ésta por glicerol 20 % (v/v). La principal suposición hace referencia a que la sal no afectó o lo hizo mínimamente a los pesos moleculares aparentes de los patrones utilizados. El calibrado de la columna se realizó con las siguientes

proteínas: β -galactosidasa (464,000 Da.), catalasa (240,000 Da.), alcohol deshidrogenasa (150,000 Da.), albúmina de suero bovino (BSA, 66,000 Da.) y albúmina de huevo (45,000 Da.). Con el volumen de elución obtenido para cada proteína patrón, se calcularon los correspondientes K_{av} , a partir de la expresión:

$$K_{av} = (v_e - v_o) / (v_t - v_o)$$

siendo v_e el volumen de elución de cada proteína, v_t volumen total, v_o volumen muerto de la columna determinado con la utilización de azul dextrano; el volumen interno se determinó con la utilización de cromato potásico. Se representó en una escala semilogarítmica el peso molecular de cada proteína patrón frente a la K_{av} correspondiente, obteniéndose una recta de calibrado en la cual se interpoló el valor para la NADP-GDH halofílica. En el caso de la cromatografía en presencia de KCl 1 M, los patrones utilizados fueron: glutamato deshidrogenasa bovina (330.000 Da.), catalasa (240,000 Da.), lactato deshidrogenasa (140,000 Da.), albúmina de suero bovina (BSA, 66,000 Da.) y ovoalbúmina (45,000 Da.); en este caso la β -galactosidasa presentó efectos de disociación, apareciendo a pesos moleculares inferiores, siendo rechazada como patrón ya que incumpliría la suposición anteriormente citada.

Una vez calibrada la columna se introdujeron 2 ml de la muestra (NADP-GDH de *Hf. mediterranei*) identificándose en la elución mediante el ensayo de actividad enzimática, mientras que la elución de las proteínas estándar se detectó midiendo la absorbancia a 280 nm. La lactato deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa fueron detectadas midiendo su actividad enzimática.



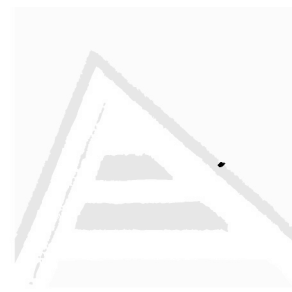
Determinación del tamaño de la subunidad.

La determinación del tamaño de la subunidad se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS, tal como se describe en el capítulo de métodos. Los patrones utilizados en este proceso fueron los siguientes: anhidrasa carbónica (29,000 Da.), albúmina de huevo (45,000 Da.), seroalbúmina (66,000 Da.), fosforilasa b (97,000 Da.), β -galactosidasa (116,000 Da.) y miosina (205,000 Da.). Al representar el log masa molecular frente al R_f , se obtuvo una relación lineal. La determinación se realizó por triplicado y la estimación del tamaño fue el valor medio con su error estándar.

4.6.1.3 Resultados y discusión.

Los valores de peso molecular obtenidos para la NADP-GDH de *Hf. mediterranei* difieren de una cromatografía a otra. En el caso del tamizado en presencia de sal (NaCl), (Figura PM.1) el valor se situaría alrededor de 340,000 Da., observándose que la proteína β -galactosidasa eluye muy próxima a la catalasa, esto hace que el ajuste por mínimos cuadrados de estos puntos a una recta tenga un coeficiente de regresión bajo ($r=0.944$). El que aparezca la β -galactosidasa próxima a la catalasa o viceversa puede ser debido al efecto de la sal sobre estas proteínas globulares de gran tamaño, LeMaire et al. (1980) describieron una disgregación parcial de la β -galactosidasa en otras condiciones, siendo una posibilidad para explicar nuestro caso, lo cual le haría eluir más tarde. También se podría deber a la aparición de interacciones de tipo electrostático sobre la proteína, de tal forma que la retuviesen dentro de la columna eluyendo a un volumen mayor.

Cuando se realizó el tamizado molecular en ausencia de sal, con glicerol 20 % (v/v), la masa molecular estimada fue de 291,000 Da. para el enzima, (Figura PM.2) con un coeficiente de regresión bueno ($r=0.994$)



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

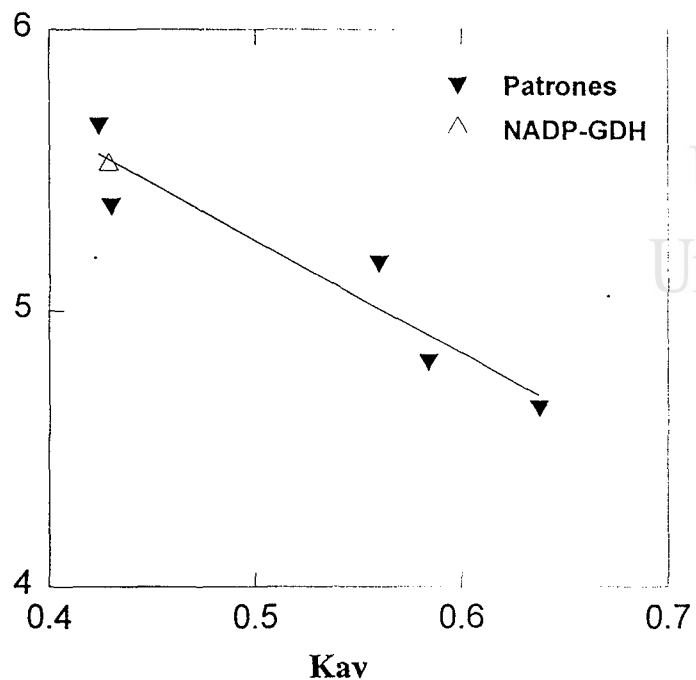


Figura PM.1: Estimación masa molecular aparente de la ADP-GDH por elución en Sepharosa CL-6B, en condiciones salinas 1 M NaCl. Los patrones estándar fueron β -galactosidasa (164,000), Catalasa (240,000), ADH (150,000), BSA (66,000) y albúmina de huevo (45,000).

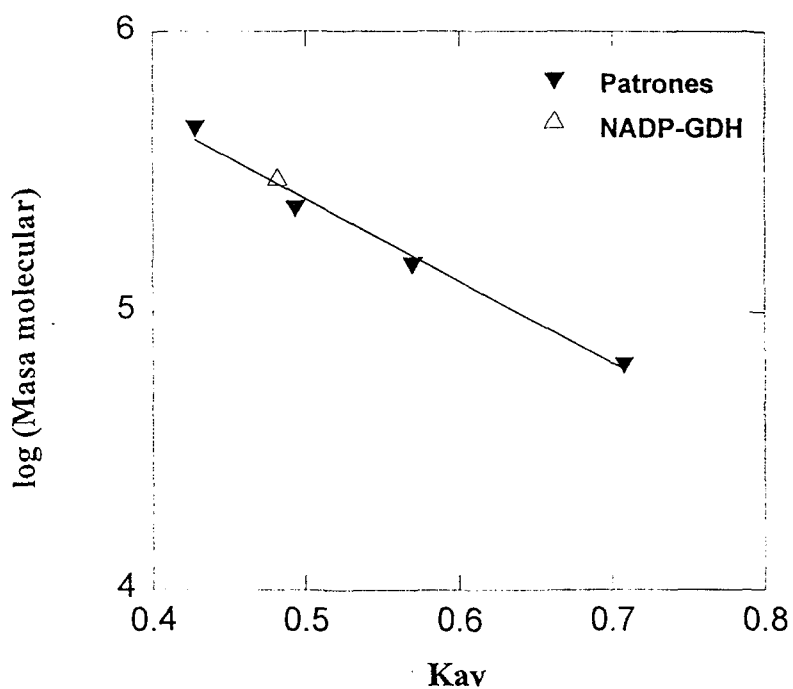


Figura PM.2: Estimación de la masa molecular aparente de la NADP-GDH por elución en Sepharosa CL-6B en ausencia de sal., en presencia de glicerol 20%. Los patrones son los mismos que en la estimación de la figura PM.1.

y no observándose el acercamiento en la elución de la β -galactosidasa y la catalasa. Debido a que las condiciones de una cromatografía y otra son las mismas, exceptuando la presencia o ausencia de sal, pensamos que ese desplazamiento en la elución de dichas proteínas podría deberse a la sal.

En el caso de la cromatografía en KCl 1M, condiciones de salinidad próximas a las fisiológicas, la masa molecular obtenida fue de $311,850 \pm 26,000$ Da. (Figura PM.3).

La masa molecular obtenida para la subunidad por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS fue de $55,000 \pm 5,000$ Da., (Figura PM.4).

A la vista de los resultados obtenidos para el peso molecular del enzima nativo y para la subunidad, la estimación de un peso molecular medio de 320,000 Da significaría que dicho enzima es un hexámero. Estas características moleculares serían similares a las obtenidas para glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes (Tabla PM.1).



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

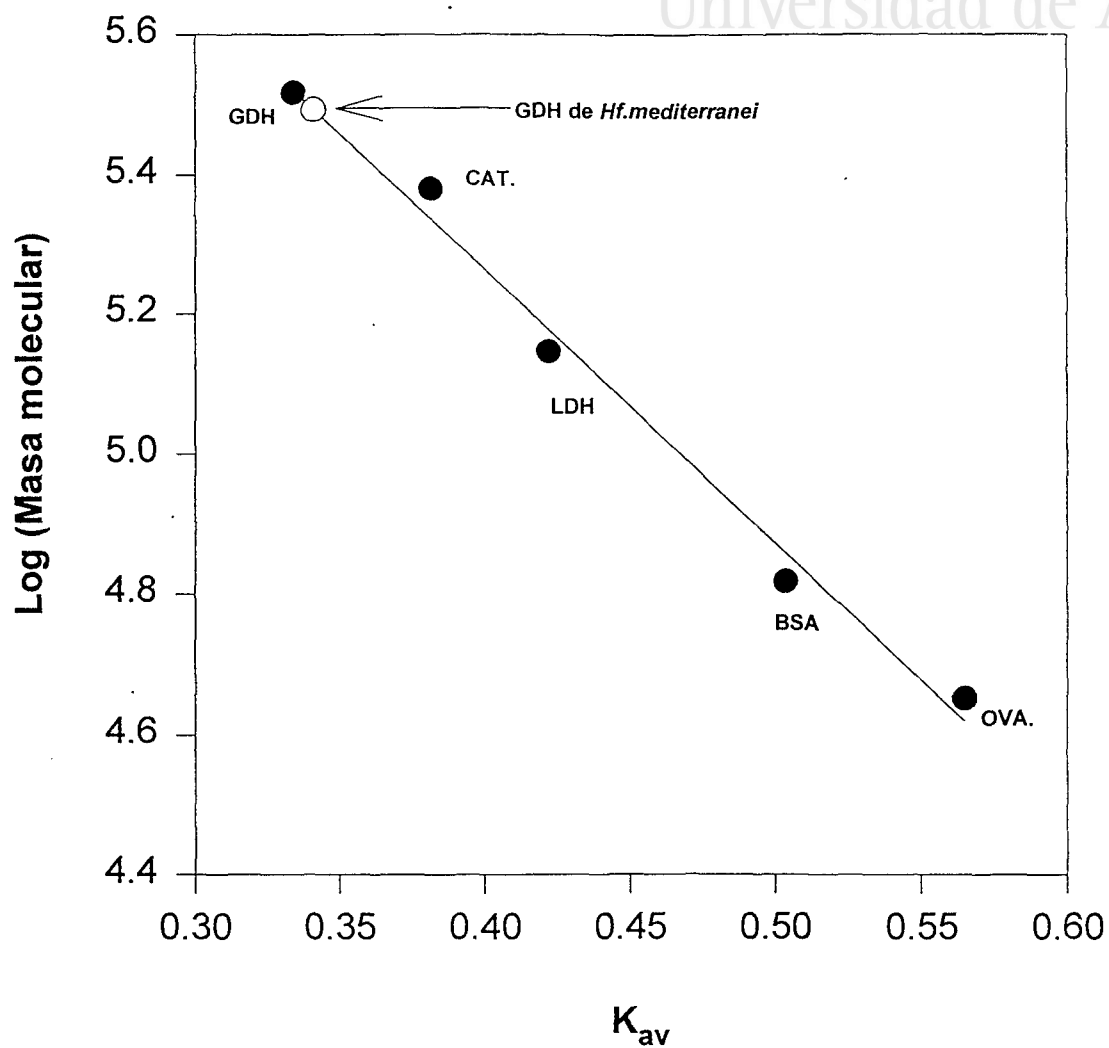
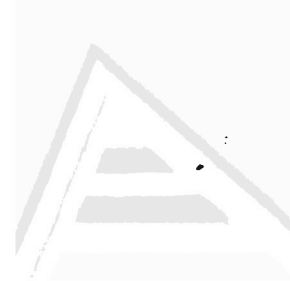
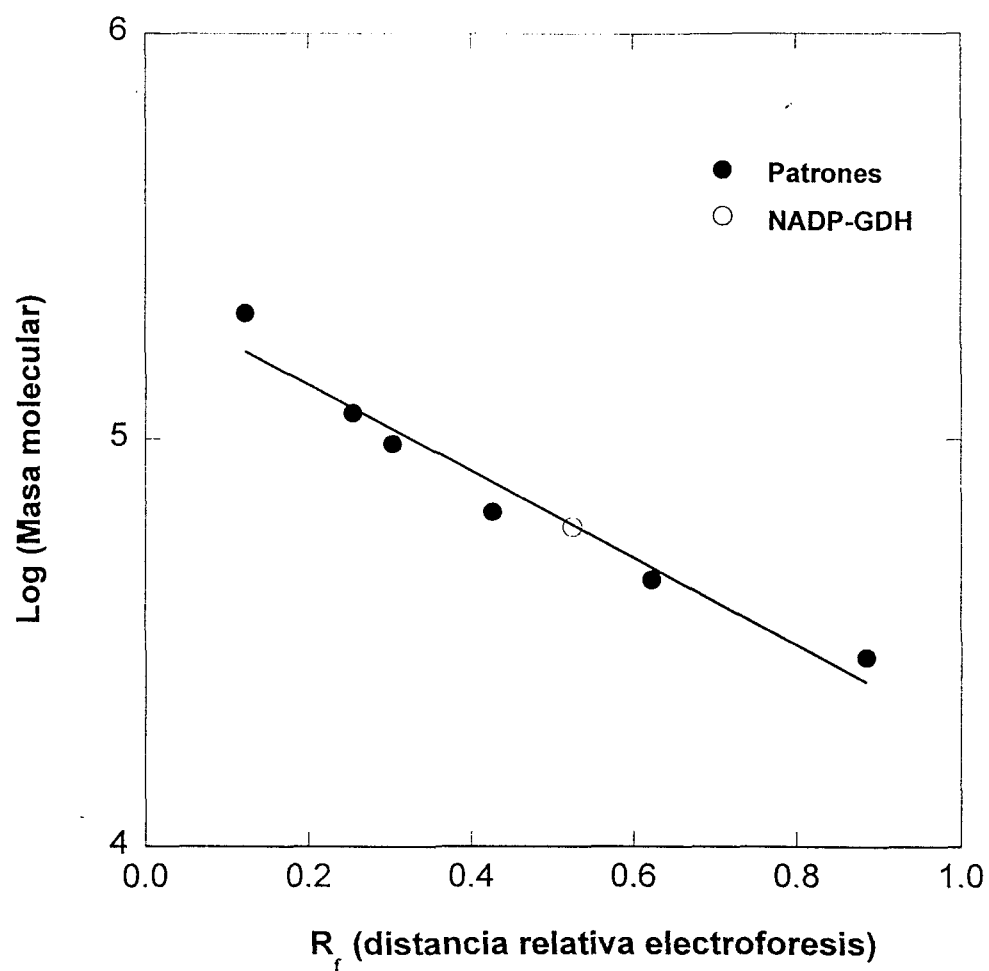


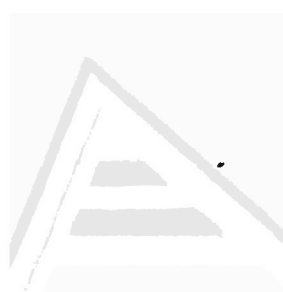
Figura PM.3: Estimación de la masa molecular aparente de la NADP-GDH por elución en Sepharosa CL-6B en presencia de KCl. Los patrones GDH (330,000 Da.), Catalasa (240,000 Da.), Lactato deshidrogenasa (140,000 Da.), BSA (66,000 Da.) y Ovoalbúmina (45,000 Da.)



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



**Figura PM.4: Masa molecular de la subunidad.
Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS.**



4.6.2 Composición de aminoácidos.

4.6.2.1 Introducción.

El análisis de aminoácidos nos facilita un parámetro importante en la caracterización de proteínas o péptidos aislados. El método más utilizado es la hidrólisis ácida donde se usa ácido clorhídrico 6 N, incubando a 110°C durante 24, 48 y 72 horas. Bajo estas condiciones algunos aminoácidos sufren modificaciones. Asparagina y glutamina son hidrolizadas a ácido aspártico y glutámico, respectivamente. Treonina y serina sufren una pérdida con el tiempo de hidrólisis, teniendo que extrapolar a tiempo cero los resultados, ya que dicha destrucción es lineal con el tiempo de hidrólisis. Triptófano generalmente no se recupera en los hidrolizados ácidos y se requieren otros métodos para la determinación de estos aminoácidos. Tirosina puede ser halogenada durante la hidrólisis con HCl. Ahora bien, la inclusión de fenol al 0.1 % (p/v) en la solución de hidrólisis previene la modificación de tirosina. Metionina está sujeta a oxidación, formándose sulfóxido de metionina durante la hidrólisis. La adición de 2-mercaptoetanol a la solución de hidrólisis previene dicha oxidación.

Durante la hidrólisis de proteínas ciertos aminoácidos alifáticos son liberados mas lentamente que otros aminoácidos. Los enlaces Ala-Ala, Ile-Ile, Val-Val, Val-Ile, Ile-Val y Ala-Val son muy resistentes a la hidrólisis, habiéndose roto del orden de un 50 a un 70% de dichos enlaces a las 24 h. de hidrólisis, a 110°C y siendo necesario el alargar el tiempo de hidrólisis incluso hasta las 92 h.

Idealmente las muestras a hidrolizar deben de ser dializadas frente a agua para minimizar cualquier interferencia en la hidrólisis de los enlaces peptídicos, y la posible destrucción o derivatización de aminoácidos por cualquier contaminante que afectase al método de análisis. Prácticamente

es imposible el desalinizar pequeñas muestras sin que conlleve una pérdida significativa de las mismas. La utilización de tampones volátiles, tipo acetato amónico, bicarbonato amónico, etc., en general no afecta negativamente a la hidrólisis. Al finalizar el tiempo de hidrólisis el ácido sobrante es eliminado por secado al vacío (Ozols J., 1990).

4.6.2.2 Metodología.

La disolución de hidrólisis empleada fue:

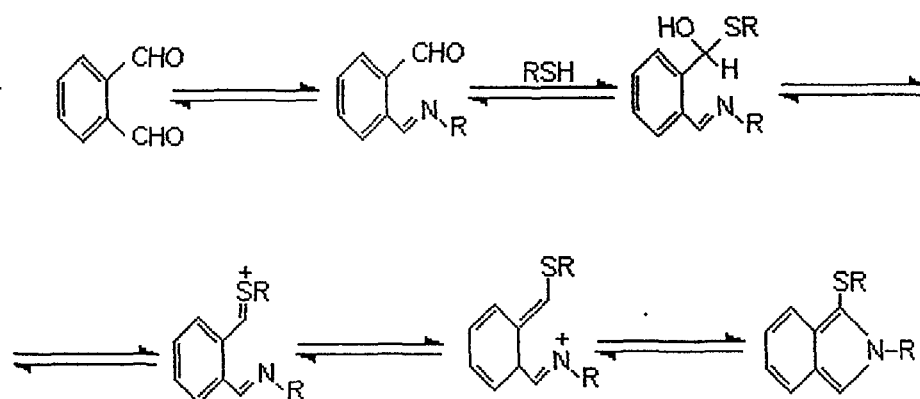
HCl	6 N
Fenol	0.1%(p/v)
2-mercaptoetanol	0.05 %(v/v)

Se utilizó fenol y 2-mercaptoetanol para prevenir la modificación de tirosina y la oxidación de metionina, respectivamente..

Cinco mililitros de muestra se dializaron frente a un litro de tampón bicarbonato amónico. Se obtuvieron 8.5 ml de dializado cuya cantidad de proteína fue de 14 µg/ml. Posteriormente se desecó en fracciones de 600 µl cuyo contenido era de 8.4 µg de proteína en un concentrador Virtis-Scurty vacu-station. El residuo se resuspendió utilizando 1 ml de solución de hidrólisis y fue traspasado a un tubo de hidrólisis, que fue cerrado al vacío.

La hidrólisis se llevó a cabo a vacío en un termobloque a 110°C durante 24, 48 y 72 h. (Smith et al., 1989; Consalvi et al., 1991), realizándose por triplicado los ensayos. Después de la hidrólisis, la mezcla se transfirió cuantitativamente a tubos apropiados y el ácido clorhídrico fue eliminado por evaporación a sequedad en un rotavapor; la eliminación total del ácido se aseguró al realizar tres ciclos de lavado del precipitado obtenido, consistente en la redisolución de las muestras con agua destilada ultrapura (18 mΩ) y posterior evaporación a sequedad.

Las muestras así obtenidas fueron sometidas a un proceso de derivatización para su posterior detección por fluorescencia; el método de derivatización utilizado fue el método OPA, el cual se ha usado ampliamente en cromatografía de aminoácidos desde que Roth (1971) descubrió las virtudes de su reacción con aminoácidos primarios en medio básico y en presencia de mercaptoetanol. El producto de reacción es un isoindol sustituido, con actividad fluorescente, en cuya formación el mercaptano juega un papel de reductor de acuerdo con la siguiente reacción:



Este método de derivatización se utiliza en conjunción con una columna de intercambio iónico (Spherisorb ODS-2). Las muestras fueron resuspendidas en 0.5 ml de agua ultrapura hasta total homogeneidad, en un tubo Ependorf se pusieron 20 μ l hidrolizado, a continuación se añadieron 100 μ l de metanol y 50 μ l de tampón borato a pH 9.5, por último se le agregó 50 μ l del agente derivatizante, agitando durante un minuto antes de ser introducida la mezcla en la columna cromatográfica, siendo crítico el tiempo transcurrido desde que se mezclan los reactivos hasta que se introducen en la columna. De esta forma se evitan los errores cometidos por la variación de fluorescencia emitida por estos derivados con el tiempo.

La cromatografía fue realizada en un HPLC. Los tiempos de retención de los distintos aminoácidos fueron estandarizados para dicha columna mediante la utilización de una mezcla estándar de 18 aminoácidos. Como control se empleó norvalina a una concentración de 20 nm/ml. Las condiciones de trabajo utilizadas se detallan a continuación.

Como patrón interno se utilizó la norvalina, aminoácido cuyo pico apareció totalmente resuelto y situado a continuación de la metionina. Además, presentó la ventaja de aparecer en una zona del cromatograma donde la reproducibilidad de los picos era muy buena.

Columna cromatográfica: Spherisorb ODS-2, 3 μ m.

Detector: fluorescencia, con una sensibilidad de 2.

Volumen de mezcla inyectada: 20 μ l.

Temperatura: ambiente.

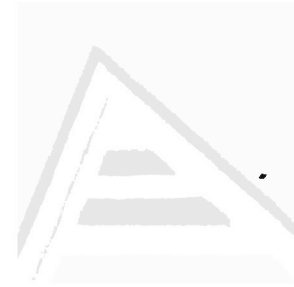
Flujo de eluyente: 1 ml/min.

Eluyente A: tampón fosfato pH 6.8 conteniendo tetrahidrofurano al 0.5 %.

Eluyente B: 50 % tampón fosfato pH 6.8, metanol 35 % más 15 % acetonitrilo.

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	0
3	0
20	35
36	60
40	70
43	100
45	0
50	0



4.6.2.3 Determinación de Triptófano.

4.6.2.3.1 Introducción.

La fluorescencia de las proteínas está originada por los aminoácidos Phe, Tyr y Trp. Las propiedades de emisión y absorción de estos tres aminoácidos aromáticos se muestran en la Tabla AA.1. En las proteínas que contienen los tres aminoácidos, la fluorescencia está normalmente dominada por la contribución de los residuos de triptófano, debido a que el rendimiento cuántico de emisión, indicado por el parámetro de sensibilidad (ver tabla), es considerablemente mayor que para Tyr y Phe. Se puede distinguir la fluorescencia de cada uno de ellos por medio de la excitación y la observación de la emisión a las longitudes de onda apropiadas. En la práctica, la fluorescencia más estudiada es la del triptófano, ya que la fenilalanina tiene un rendimiento cuántico muy bajo y la fluorescencia de la tirosina suele ser muy débil debido a la extinción. Si está ionizada, la fluorescencia de la tirosina resulta casi totalmente extinguida al igual que si se halla en las cercanías de grupos amino o carboxilo, o de un triptófano. No obstante, puede detectarse en determinadas circunstancias excitando con luz de longitud de onda 280 nm.

Tabla AA.1. Longitudes de onda de absorción y emisión de los aminoácidos Trp, Tyr y Phe, disueltos en agua a pH neutro.

	Absorción		Fluorescencia (emisión)		
	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon_{\max}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	Φ_F^b	sensibilidad $\epsilon_{\max}^* \Phi_F^b$
Trp	280	5600	348	0.2	1100
Tyr	275	1400	303	0.14	200
phe	257	200	282	0.04	8

Los cambios en la conformación de la proteína vienen acompañados por cambios en la emisión de fluorescencia; si la proteína no posee triptófano los cambios en la emisión de tirosina son predominantemente cambios en intensidad, apareciendo el máximo de fluorescencia alrededor de los 303 nm. En proteínas que poseen triptófano, las variaciones en intensidad son generalmente debidas a modificaciones en el plegamiento de la misma, la emisión debida al triptófano en proteínas nativas puede ser mayor o menor que la emisión del aminoácido libre en disolución acuosa. El máximo de emisión habitualmente se encuentra desde longitudes de onda corta hasta 350 nm., que corresponde al máximo de emisión de Trp en disoluciones acuosas. La localización exacta de este máximo depende de la naturaleza y concentración del tampón.

La emisión de fluorescencia debida a Tyr y Trp en proteínas es observada al excitar cerca del máximo de absorción (280 nm). La fluorescencia debida al Trp puede ser investigada selectivamente al excitar a longitudes de onda ≥ 295 nm.

Determinación fluorimétrica del contenido de Trp en proteínas.

El número de residuos de Trp presentes en una proteína puede ser determinado comparando los espectros de emisión de la proteína con los espectros de disoluciones de Trp de concentración conocida. Para ello la proteína se despliega previamente, exponiendo así los residuos de triptófano que hubiese en el interior de la misma. Este análisis consiste en los siguientes pasos:

(i) La proteína a una concentración de 0.01 a 0.05 mg/ml es desplegada por incubación en 6.0 M de Gdn-HCl, pH 7.0, durante 60 min. Para la reducción de los puentes disulfuro de la proteína se añade 2 - mercaptoetanol 30 mM.

(ii) El espectro de emisión de esta disolución y del disolvente son registrados entre 300 nm y 400 nm. La excitación puede ser a 295 nm, para obtener sólo la fluorescencia del triptófano.

(iii) Bajo idénticas condiciones experimentales y condiciones de disolvente, se obtienen los espectros de las disoluciones de triptófano libre.

(iv) El número de residuos de triptófano, n_{Trp} , es igual a:

$$n_{Trp} = \frac{C_{Trp}}{(1.1 \times C_p)}$$

donde C_p es la concentración molar de proteína y C_{Trp} es la concentración molar de Trp. El factor de 1.1 se ha encontrado al calibrar este método con proteínas de contenido en Trp conocidas (Payot, P., 1976).

4.6.2.3.2 Metodología

Debido a la alta sensibilidad de las medidas de fluorescencia, las muestras deben de estar libres de impurezas en el mayor grado posible. Generalmente, las muestras se filtran con filtros de 0.45 μm ., o se centrifugan para eliminar estas partículas. Una simple partícula que interfiera en el haz de luz puede causar fuertes distorsiones en la señal. Muchas veces para ayudar a mantener la muestra en disolución durante la medida de fluorescencia se usa un imán en la cubeta y de esa forma agitar la disolución.

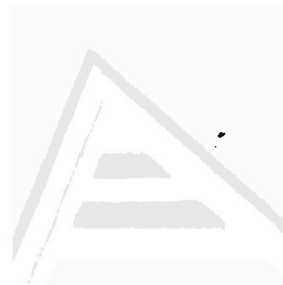
Se utilizó una muestra de glutamato deshidrogenasa purificada con una concentración de 0.012 mg/ml, disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.3, conteniendo 20 % glicerol y 0.5 M NaCl. Se realizó el espectro de emisión de la proteína nativa entre 300 y 400 nm. y excitando a 295 nm. Posteriormente se prepararon dos muestras, ambas conteniendo 2-mercaptoetanol e incubando durante 60 min., una en Gdn-HCl 6 M y otra

en urea 8 M., agentes desnaturalizantes comunmente usados y que no interfieren en las medidas. Transcurridos los 60 minutos, las muestras se filtraron a través de filtros de 0.45 μm y se realizaron los espectros de emisión de las muestras desnaturalizadas, manteniéndose en continua agitación.

Con las disoluciones de triptófano libre se procedió de la misma forma, se disolvió éste en el mismo disolvente citado anteriormente y se realizó el espectro de emisión entre 300 y 400 nm con una longitud de onda de excitación de 295 nm. Las disoluciones de triptófano variaron desde 10^{-2} a 5×10^{-5} M.

4.6.2.3.3 Resultados

Al realizar la representación del logaritmo de las intensidades de fluorescencia frente al logaritmo de la concentración de triptófano (Figura AA.1) se obtuvo una línea recta con un coeficiente de correlación $r=0.98$, y se interpolaron los valores de fluorescencia obtenidos para la proteína desnaturalizada (o al menos inactiva). Aplicando la fórmula descrita en el método anteriormente mencionado, se obtuvo un n_{Trp} aproximado a 42 aminoácidos de triptófano en total, lo que supondría por subunidad un total de 7 residuos de triptófano por cada una.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

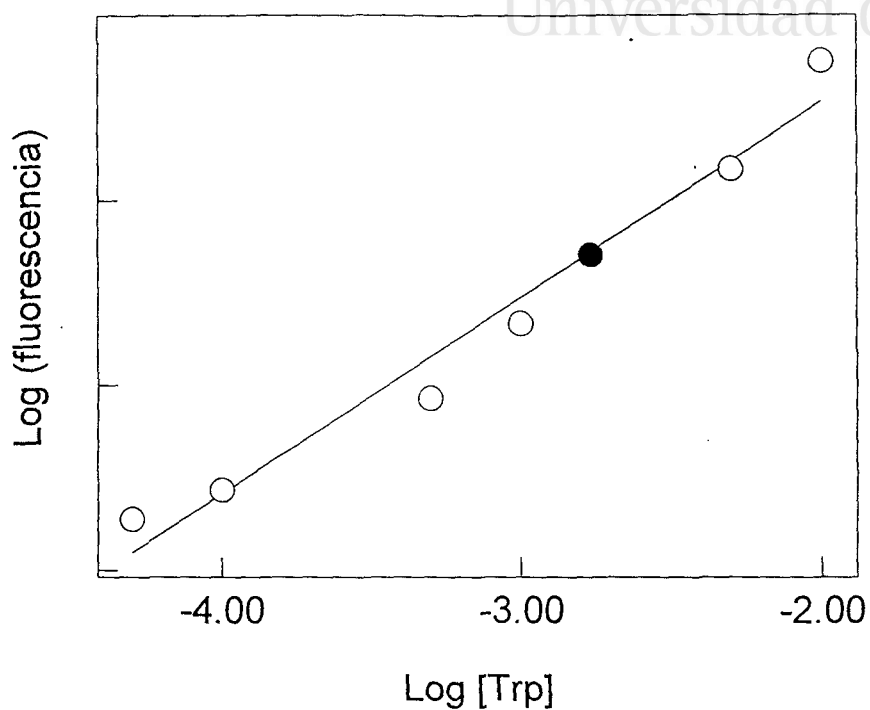


Figura AA.1: Los puntos huecos representan el logaritmo de las distintas concentraciones de triptófano libre, concentraciones de 10^{-2} a 5×10^{-5} M, en disolución de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.3, 20% glicerol y 0.5 M NaCl, más el agente desnaturizante (Gnd-HCl 6M y 2-mercaptoetanol 30 mM). El punto negro representa la interpolación de la fluorescencia de la proteína.



4.6.2.4 Resultados y Discusión.

La composición de aminoácidos obtenida para NADP-GDH de *Hf. mediterranei* se muestra en la Tabla AA.2 expresada en % y en número de residuos/ subunidad. Se ha tomado un peso molecular de subunidad de 55.000 Da. Los valores de serina y treonina proceden de los resultados obtenidos a 24 y 48 h. Los valores para valina, isoleucina y leucina corresponden a los obtenidos después de 72 h de hidrólisis, para el resto de aminoácidos se realizó la media aritmética entre 24, 48 y 72 horas de hidrólisis. El triptófano no fue determinado por esta técnica, sino por espectrofluorimetría. La cisteína se pierde en la hidrólisis ácida por oxidación a sulfóxido. Prolina no puede ser determinado mediante el método OPA de derivatización, ya que no es un aminoácido primario. Con la columna utilizada no fue posible separar aspártico y glutámico, obteniéndose en un mismo pico los aminoácidos ácidos, aunque más que un problema de la columna fue del detector, ya que el disponible tenía un volumen muerto grande (20 µl.), produciéndose la consiguiente difusión de la muestra al llegar al detector, y al poseer tiempos de retención muy pequeños aparecen como un solo pico.

Para comparar la composición de aminoácidos con la descrita en otras glutamato deshidrogenasas de diferentes organismos (Tabla AA.3) se utilizó la fórmula matemática propuesta por Harris y Teller (1973), que define la divergencia en la composición.

$$\text{Divergencia composición} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_{i,A} - X_{i,B})^2}$$

Tabla AA.2

Composición de aminoácidos de la subunidad de glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*. Se expresan en número de residuos/subunidad tomando como peso molecular de la subunidad 55.000 Da. Ser y Thr se han extrapolado a tiempo de hidrólisis cero. Trp se ha calculado por espectrofluorimetría. Val, Ile y Leu se han tomado de los valores obtenidos a tiempo de hidrólisis de 72 horas. Los valores para el resto de aminoácidos son media de los tres tiempos de hidrólisis.

Aminoácidos	residuos / subunidad	mol%
Asp+Glu	92	21,51
Ser	27	6,41
Gly	33	7,78
Thr	21	4,83
His	8	1,89
Ala	27	6,35
Arg	12	2,79
Tyr	22	5,08
Val	87	20,41
Met	16	3,76
Phe	10	2,37
Ile	21	5,02
Leu	20	4,79
Lys	23	5,34
Trp	7	1,66
TOTAL	426,00	

donde n es el número de aminoácidos a comparar, $X_{i,A}$ valor normalizado del aminoácido i en la proteína A y $X_{i,B}$, el valor normalizado del aminoácido i en el proteína B, expresados en residuos por 100 residuos. Cuanto más bajos sean estos valores mayor será la semejanza en la composición aminoacídica. Smith et al. (1989) al utilizar esta fórmula para comparar la composición aminoacídica de la glucosa deshidrogenasa de *Thermoacidophilic archaeobacterium* con la de *Sulfolobus solfataricus* (otra archaea), y con dos eubacterias (expresando las X_i en residuos por 1000 residuos, los valores obtenidos resultaron de un orden de 10 veces mayor en comparación con los aquí reflejados para la GDH), encontraron que la divergencia en la composición tiene un valor con respecto a las archaeas de 47 y con respecto a las eubacterias de 69 y 62. *S.solfataricus* mostró unos valores de 88 y 87 con respecto a las eubacterias. Estos valores sugirieron a los autores que las dos deshidrogenasas de archaeas presentan una homología significativa en cuanto a la composición.

Al comparar la composición de aminoácidos de la glutamato deshidrogenasa de *Hf.mediterranei* con la composición aminoacídica del enzima de tres archaeas: *P.furiosus*, *S.solfataricus* (termófilos extremos), y *H.marismortui* (halófilo extremo), un eucariota *C.sorokiana* y la procedente de una eubacteria, *E.coli*, (Tabla AA.3) se observó que el contenido de aminoácidos ácidos en las cuatro archaeas es elevado entre un 21.5 y 23.64, con respecto al mostrado por la eubacteria, ya que el valor reflejado para este organismo como Asp+Glu representa el contenido en Asp+Glu+Asn+Gln.

El contenido de serina resultó ser del mismo orden en las dos proteínas halófilas (6 aminoácidos por cada 100 aminoácidos) y en la eucariota. Sin embargo, el contenido de glicina fue inferior en *Hf.mediterranei* del resto de proteínas, estando más próximo a las dos termófilas. Es de destacar el alto contenido de valina en este enzima con respecto a los demás; se realizaron diversos análisis y en todos ellos el contenido de valina aparecía muy elevado llegando a pensar que el



Tabla AA.3

de la composición aminoacídica obtenida por hidrólisis ácida del enzima glutamato deshidrogenasa con la obtenida en otros organismos. Se muestra la divergencia en la composición. Trp se ha obtenido por espectrofluorimétricas. n.d. = valor no determinado.

Composición aminoacídica (residuos/100 residuos)						
<i>Haloferax mediterranei</i>	<i>Pirococcus furiosus</i> ^a	<i>Sulfolobus solfataricus</i> ^b	<i>Halobacterium marismortui</i> ^c	<i>Chlorella sorokiana</i> ^d	<i>E. coli</i> ^e	linaje D ₅ H ₃ G ₇
21,51	22,51	21,50	23,64	21,86	14,97	
6,41	5,28	4,63	5,91	6,07	7,26	
7,78	8,81	8,85	10,68	10,93	12,22	
4,83	6,62	6,95	6,82	4,86	7,20	
1,89	1,58	1,28	0,68	1,21	2,15	
6,35	10,03	6,95	12,27	10,12	9,96	
2,79	5,12	4,22	4,32	5,67	6,47	
5,08	3,69	4,22	5,00	4,25	2,86	
20,41	9,08	9,71	9,09	7,69	6,13	
3,76	1,21	1,48	0,91	3,04	4,85	
2,37	2,88	3,38	3,41	3,04	6,16	
5,02	8,16	9,71	5,23	4,66	3,74	
4,79	6,84	10,13	7,50	7,89	7,80	
5,34	8,18	5,70	2,95	7,69	8,23	
1,66	n.d.	1,28	1,59	1,01	n.d.	
composición	13,59	13,70	14,37	14,98	18,41	

^a*P. furiosus*; descrita por XU et al. (1991). Trp no fue determinado.

^b*S. solfataricus*; descrita por Consalvi et al. (1991).

^c*H. marismortui*; descrita por Leicht et al. (1978).

^d*C. sorokiana*; descrita por Gronostajski et al. (1978).

^elinaje D₅H₃G₇; descrita por Lin y Reeves (1991).

problema pudiese estar inducido por una contaminación, debido a que el aminoácido patrón de la columna de HPLC fue norvalina, aunque este aminoácido aparecía bien definido y en la concentración correcta en los cromatogramas. También es destacable el bajo contenido de fenilalanina; este último hecho ya fue descrito al analizar la composición aminoacídica a partir de la secuencia de la glutamato deshidrogenasa de *H.salinarium* (Benachenhou et al. 1991). El contenido de aminoácidos básicos (Arg y Lys) es menor en las dos proteínas halófilas que para el resto de glutamato deshidrogenasas, siendo la más próxima la de *S.solfataricus*. Estos resultados están de acuerdo con los mostrados por Gandhir et al. (1995) donde analizan comparativamente el contenido de aminoácidos de las proteínas de *Hf.mediterranei*, *Halomonas elongata* (organismo eubacteriano halotolerante) y *E.coli*, encontrando que las proteínas halófilas tienen un mayor contenido en aminoácidos ácidos y un empobrecimiento del contenido de lisina, con respecto a *E.coli*. Interpretando estos resultados como una evolución convergente de los dos organismos halófilos, en cuanto a la composición química de sus proteínas. También es reseñable el alto contenido de valina presente en la composición de las proteínas de *Hf.mediterranei*.

Al analizar la divergencia obtenida en la composición, se observó que las glutamato deshidrogenasas con una composición aminoacídica más semejante a *Hf. mediterranei* fueron las otras dos Archaeas. Cuando se compararon la GDH de *Hf.mediterranei* con las procedentes tanto del Dominio Eucarya como con las del Dominio Bacteria, aquí reflejadas, presentó una mayor semejanza con la GDH de Eucarya que con la de Bacteria, mostrando esta última un valor de divergencia en la composición netamente separado del resto de valores.



4.6.3 Secuencia aminoacídica N-terminal.

4.6.3.1 Introducción.

La identificación del N-terminal de proteínas y péptidos es importante para el aislamiento de clones de DNA recombinante y para la caracterización estructural y funcional de dominios de proteínas. El paso más importante es obtener una secuencia N-terminal sin ambigüedades. Procediendo, una vez obtenida dicha secuencia, a realizar la identificación y clonaje del gen.

El clonaje puede considerarse como el último paso de purificación. Mediante la utilización de métodos de DNA recombinante, es posible obtener la secuencia completa del DNA que codifica a una proteína, pudiéndose extraer grandes cantidades de proteína por introducción de este DNA en el sistema de expresión más adecuado. Esta técnica de producir polipéptidos permite asignar una actividad biológica definida a la proteína. La expresión de la proteína en un sistema recombinante es de utilidad obvia, ya que la proteína estudiada está disponible normalmente en pequeñas cantidades y sólo después de largos procesos de purificación. Por otro lado, la estructura primaria de la proteína puede ser determinada por estos métodos de DNA recombinante. Esta información, complementada con la caracterización previa de la proteína, puede ser usada para comprender sus características estructurales y funcionales.

Para llevar a cabo estas técnicas de clonaje se utilizan fundamentalmente como sondas dos tipos de oligonucleótidos, que pueden ser diseñados a partir de la secuencia de la proteína. Un grupo de estos oligonucleótidos son relativamente cortos y contienen todas las posibles secuencias de nucleótidos que pueden codificar a una cadena aminoacídica. Debido a que el código genético es degenerado, la longitud de estas sondas está limitada por el número de secuencias diferentes que

uno desee introducir en el grupo de sondas. El otro tipo de oligonucleótido que puede diseñarse es relativamente largo, y posee una baja degeneración debido a que presupone que un aminoácido vendría codificado por un solo codón.

4.6.3.2 Metodología.

Una vez aislada y purificada la proteína, se realizó una electroforesis en SDS-PAGE al 12.5% y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF usando la técnica Western-Blot descrita en el capítulo de Materiales y Métodos, seguidamente se efectuó la secuenciación del N-terminal que fue llevada a cabo en un secuenciador en fase gaseosa Applied Biosystems 470A, acoplado a un analizador 120A de feniltiohidantoína, procedimiento efectuado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Bath (U.K.) por los Drs. Michael J.Danson y David W.Hough.

4.6.3.3 Resultados y discusión.

La secuencia N-terminal obtenida para la GDH NADPH-dependiente de *Hf.mediterranei* fue:

Ala Gln Glu Ala Asn Pro Phe Glu Ser X Gln Glu Ala Ile Asp Asp

Secuencia formada por 17 aminoácidos, suficiente para la construcción de sondas de oligonucleótidos para su posterior utilización en los procesos de clonaje.

Al realizar la comparación de dicha secuencia con otras secuencias N-terminales de glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes y teniendo en cuenta que, para buscar la mayor coincidencia, la introducción de huecos está penalizada, se intentó introducir los menos posibles (Figura N1). Se comparó dicha secuencia con secuencias N-terminales tanto de

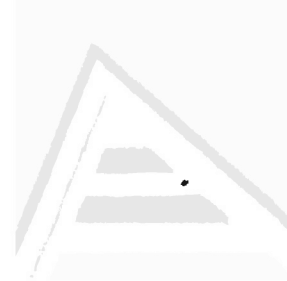


Figura N1.: Comparación de secuencias N-terminal

<i>Haloferax mediterranei</i>	A	Q	E	A	N	P	F	E	S	G	Q	E	A	I	D	D							
ES4	V	E	Q	-	D	P	F	E	I	A	V	K	Q	L	E	R	A	A	Q	Y	M	I	S
<i>Thermococcus litoralis</i>	V	E	Q	-	D	P	F	E	I	A	V	K	Q	L	E	R	A	A	Q	Y	M	D	I
<i>Picrococcus furiosus</i>	V	E	Q	-	D	P	Y	E	I	A	V	K	Q	L	E	R	A	A	Q	Y	M	E	S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P	E	C	-	Q	A	Y	E	E	V	V	S	L	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Halobacterium salinarium</i>	M	T	M	A	S	K	S	D	S	T	E	D	-	E	A	A	D	S	-	-	-	-	-
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	M	E	E	L	S	S	S	L	Y	Q	Q	V	K	K	L	Y	-	-	-	-	-	-	-

En rojo se señalan los aminoácidos iguales que ocupan la misma posición en alguna de las secuencias.
 En azul aminoácidos que presentan cadena lateral semejante. (E). grupos ácidos en cadenas laterales. Asp por Glu)
 En verde aminoácidos que corresponden a una modificación puntual de la cadena lateral. (Introducción o eliminación de un grupo funcional).
 Claves de aminoácidos: A=ala, D=asp, E=glu, F=phe, G=gly, I=ile, K=lys, L=leu, M=met, N=asn, P=pro, Q=gin, R=arg, S=ser, T=thr, V=val, Y=tyr.

Archaeas (termófilos) como con la NADP-GDH de *Saccaromyces cerevisiae*, organismo eucariota, y con una GDH halofílica de *Halobacterium salinarium* con la que mostró una menor coincidencia si se tiene en cuenta el número de huecos introducidos, ello puede deberse a que la secuencia N-terminal para esta proteína no se ha realizado por secuenciación directa de la proteína, sino por secuenciación de DNA (Benacheuhou y Baldacci, 1991) y actualmente se piensa que puede no ser la NADP-GDH, sino la NAD-dependiente (Engel, P.C., 1994; Bonete, M.J., 1994 comunicación personal).

En la secuencia N-terminal de *Hf.mediterranei* se observa un fragmento de tres aminoácidos (P F E), que está presente en las otras archaeas ES4 y en *Thermococcus litoralis*, y parcialmente en *Pirococcus furiosus*, donde aparece sustituido uno de los aminoácidos por otro con una cadena lateral semejante, Phe por Tyr; la comparación se realizó en base a centrar esta secuencia e introducir el menor número de huecos, de tal manera que se obtuviera la mayor coincidencia posible.

Los aminoácidos señalados en verde en la Figura N1, son aminoácidos cuya codificación en el DNA viene dada por los siguientes tripletes:

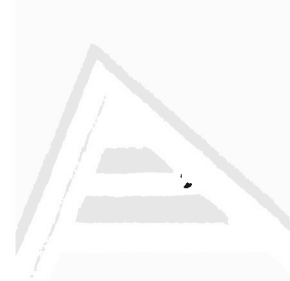
N: AAC, AAT	Q: CAG, CAA
D: GAC, GAT	E: GAG, GAA

observándose que sólo varía un nucleótido, en el extremo 5' en ambos casos, pudiendo haber ocurrido en el cambio de Gln por Glu una transversión ya que se habría producido una sustitución de una base púrica por una pirimidínica o viceversa; en el caso de Asn por Asp sería una transición ya que se habría sustituido una base púrica por otra de la misma naturaleza.

Los aminoácidos señalados en azul son aminoácidos que poseen cadenas laterales semejantes, de tal forma que la sustitución de un por otro no altera la funcionalidad, estructura o estabilidad de la proteína.

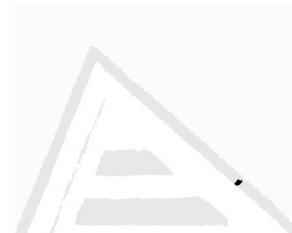
Por otro lado la frecuencia de cambio de Phe por Tyr es muy abundante en la naturaleza, formando junto con el Trp lo que se conoce como un grupo de intercambio. Val, Leu e Ile, forman otro grupo de intercambio desde el punto de vista del tamaño de la cadena lateral, dicho tamaño así como la naturaleza química de la cadena lateral es importante desde el punto de vista estructural (Schulz y Schirmer, 1979).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta ahora, se puede observar que existe una gran homología entre las distintas secuencias N-terminales de NADP-GDH de Archaeas, exceptuando la de *Sulfolobus solfataricus*, que es la que menor homología presenta en dicha secuencia, estando ésta secuencia N-terminal bastante conservada en un organismo eucariota como es *Saccaromyces cerevisiae*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5. CONCLUSIONES.



(1) Se ha observado una regulación en los niveles de NADP-GDH en respuesta a la fuente de nitrógeno del medio. Cuando la fuente de nitrógeno fue nitrato se obtuvo una disminución de la actividad enzimática, manteniéndose constante el nivel de proteínas totales respecto del nivel obtenido en el cultivo previo, lo que supondría que la asimilación de nitrógeno se realizaría por vías alternativas donde no participara la NADP-GDH. Al cambiar dichas células a un cultivo, que como fuente de nitrógeno poseía amonio, se recuperó la actividad manteniéndose constante el nivel de proteínas totales, lo que apuntaría a una regulación en cuanto a la síntesis de dicha proteína dependiente de la fuente de nitrógeno.

No se produjo ningún efecto al variar la fuente de carbono, pudiéndose concluir que el enzima no está regulado por ésta.

(2) Los cationes monovalentes producen un aumento tanto en la estabilidad como en la actividad enzimática, alcanzando su máximo de actividad a concentraciones menores de potasio que de sodio. Los cationes divalentes, a excepción del magnesio que produce un aumento de la actividad enzimática hasta una concentración 1 M y posteriormente decrece, provocan inhibición no pudiéndose realizar la sustitución de cationes monovalentes por divalentes.

Todos los aniones ensayados muestran una mayor actividad a un mismo rango de fuerza iónica independientemente de la naturaleza de los mismos; no siendo tan importante el anión de que se trate como de a qué concentración se encuentre.

El glicerol resultó ser un buen sustituyente de la sal en cuanto a la estabilidad.

(4) El enzima es muy estable a temperaturas de 40 a 50 °C; la temperatura óptima se sitúa a 60°C y muestra una temperatura de inactivación de 74°C, todo ello hace que sea un enzima ideal para aplicaciones biotecnológicas, pues, si el medio donde se está utilizando sufre una desviación puntual de la temperatura de trabajo, no se producirá la inactivación del enzima.

El que los valores de la energía de activación del proceso de desnaturalización y la entalpia de dicho proceso sean próximos implica que este proceso está gobernado por destrucción de enlaces con desplegamiento de la proteína.

(5) La NADP-GDH en el sentido de aminación reductiva y en ausencia de sal, muestra un mecanismo secuencial ordenado con una etapa de equilibrio rápido en la unión del 2-oxoglutarato. Teniendo en cuenta que es posible convertir un mecanismo ordenado de estado estacionario en un mecanismo con etapas de equilibrio rápido, simplemente cambiando las condiciones de actuación del enzima, parece verosímil pensar que el mecanismo en presencia de sal sea un mecanismo secuencial ordenado de estado estacionario tal como se ha descrito en la NADP-GDH de *H.halobium*.

(6) Por los estudios de pH se puede vislumbar el mecanismo químico implicado en la unión de los sustratos al enzima. En la unión del NADPH interviene un grupo imidazólico no protonado de histidina o un ϵ -amino de lisina. En la del 2-oxoglutarato un ϵ -amino protonado o un grupo hidroxilo fenólico de tirosina o un grupo guanidinio de arginina, este residuo actuaría como catalizador ácido-base. En la unión del amonio interviene un α -amino de un aminoácido terminal. El amonio se uniría más en la forma NH_3 que en la protonada. El mecanismo químico quedaría más o menos establecido como sigue: el NADPH cedería electrones (protones) al grupo imidazólico no protonado y éste a su vez los transfiere a la lisina reactiva, que actuaría

como catalizador ácido-base, que a su vez donaría un electrón al grupo carbonilo del 2-oxoglutarato unido, simultáneamente el amonio en forma de NH_3 reaccionaría para formar carbinolamina.

(7) En cuanto a la estructura de la proteína, es un hexámero con peso molecular de subunidad de 55,000 Da y un peso molecular total medio de 320,000 Da., lo que es acorde con la familia de NADP-GDH dependientes.

(8) En cuanto a la composición de aminoácidos: el contenido de aminoácidos ácidos es más elevado que en sus contrapartidas no halófilicas, y muestra una menor divergencia en cuanto a la composición con respecto a las eucariotas que a las eubacterias aquí comparadas.

(9) El N-terminal presenta una gran homología dentro de las distintas Archaeas y a su vez con respecto a la eucariota estudiada.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. BIBLIOGRAFIA

- Aitken, D.M. y Brown, A.d. (1972) Properties of halophilic nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochem. J.* **130**, pp.645-662.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1984) Mechanism of protein salting-in and salting-out by divalent cations salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry.* **23**, pp.5912-5923.
- Argos, P. et al. (1979). Referenciado en Rao y Argos (1981). *Biochemistry.* **18**, pp.5698-5703.
- Bonete, M.J., Camacho, M., y Cadenas, E. (1986). Purification and some properties of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium*. *Int.J.Biochem.* **18**, 9, pp 785-789.
- Bonete, M.J., Camacho, M., y Cadenas, E. (1987) A new glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium* with different coenzyme specificity. *Int.J.Biochem.* **19**, 12 pp 1149-1155.
- Bonete, M.J., Camacho, M.L. y Cadenas, E. (1989). Kinetic mechanism of *Halobacterium halobium* NAD-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **990**, pp.150-155.
- Braña A.F., Paiva N. y Demain A.L. (1986) Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1305-1317.
- Baker P.J. et al. (1992). Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins.* **12**, pp.75-86.

- Baxter, R.M. (1959). An Interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **5**, pp. 47-57.
- Benachenhou-Lahfa, N. y Baldacci, G. (1991). The gene for halophilic glutamate dehydrogenase: sequence, transcription analysis and phylogenetic implications. *Mol. Gen. Genet.* **230**, pp. 345-352.
- Benachenhou-Lahfa, N., Forterre, P. y Labedan, B. (1993). Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogues protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. *J. Mol. Evol.* **36**, pp. 335-346.
- Berdis, A.J. y Cook, P.F. (1993). Overall kinetic mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Biochemistry.* **32**, pp.2036-2040.
- Bernlohr, R.W., Schreier, H. y Donohue, T.J. (1986) Enzymes of glutamate and glutamine biosynthesis in *Bacillus licheniformis*. *Current Topics in Cellular regulation.* **24**, pp.145-152.
- Birkoff, J.J., y Banaszak, L.J. (1984). Referenciado en Haeffner-Gormley et al. 1992. *Pept. Protein Rev.* **4**, pp.1-46.
- Blauer, G., y Sund, H., (1977). Referenciado en Srinivasan, R. (1991). *Biopolymers*, **16**, pp. 1053-1061.
- Bogoñez, E., Satrustegui, J. y Machado, A. (1985). Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase(NADP⁺) from *Saccaromyces cerevisiae* *J. Gen. Microbiol.* **131**, pp.1425-1432.

Bradford, M.M.. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, pp. 248-254.

Britton, K.L., Baker P.J., Engel P.C., Rice D.W. y Stillman T. (1993). Evolution of substrate diversity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. *J.Mol.Biol.* **234**, pp.938-945.

Brown, J.R. y Doolittle, W.F. (1995). Root of the universal tree of life based and ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **92**, pp.2441-2445.

Brown, A.D. (1964). Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* **28**, pp.296-330.

Brun, A., Chalot, M., Botton, B., y Martin, F. (1992). Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria Laccata*. *Plant Physiol.* **99**, pp. 938-944.

Bull, H.B. y Breese, K. (1973). Referenciado en Ragone et al. 1992. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, pp.681-686.

Cadenas, Ch. (1985). Comportamiento cinético de la malato deshidrogenasa de *H.halobium*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.

Calmettes, P., Eisenber, H. y Zaccai, G. (1981). Referenciado en Zaccai et al., 1989. *Biophys. Chem.* **26**, pp.276-290.

- macho, M.L., Bonete, M.J. y Cadenas, E. (1993). NAD-glútamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium*: pH and chemical modification studies. *Int. J. Biochem.* **25**, (7), pp. 979-985.
- Irvañal, N. y Kessi, E. (1988). Kinetic mechanism of octopine dehydrogenase from the muscle of the sea mollusc, *Concholepas concholepas*. *Biochim. Biophys. Acta.* **953**, pp.14-19.
- Mazzulo, J.J. (1973). On the regulatory properties of halophilic citrate synthase. *FEBS letters.* **30**, pp. 339-342.
- Mazzulo, J.J. (1975) Las bacterias halófilas extremas. II Enzimología y metabolismo. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* **7**, pp. 68-80.
- Mazzulo, J.J. y Vidal, M.C. (1972). Effect of monovalent cations on the malic enzyme from the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *J. Bacteriol.* **109**, pp. 437-439.
- Mishalabi, P., Maniscalco, S., Cohn, L.E. y Fisher, H.F. (1987). Referenciado en Srinivasan, R. (1991). *Biochim. Biophys. Acta.* **913**, pp. 103-110.
- Mohanatry, J.A., Schafer, P.H., Kim, M.S., y LeMaster, D.M. (1993). Synthesis of alfa-beta-deuterated ¹⁵N amino acids using a coupled glutamate dehydrogenase-branched-chain amino acid aminotransferase System. *Anal. Biochem.* **213**, pp. 147-151.
- Cleland, W.W. (1963). The Kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. II. Inhibition: nomenclature and theory. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta.* **67**, pp.104-196.

- eland, W.W. (1967). Enzyme kinetics. *Ann. Rev. Biochem.* **36**, pp.77-112.
- eland, W.W. (1970). Steady state Kinetics. En: "The Enzymes". (Ed. P.D. Boyes). Vol.II, pp.1-65, Academic Press Inc. New York.
- eland, W.W. (1977). Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Avd. Enzymol.* **45**, pp.273-387.
- eland, W.W. (1979). Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods in Enzymology.* **63**, pp.103-138.
- eland, W.W. (1982). The use of pH studies to determine chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. *Methods in Enzymology.* **87**, pp.390-405.
- Cohen, A., Lam, W.L., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., y Schalkwyk. (1992). Localizing genes on the map of the genome of *Haloferax volcanii*, one of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, pp.1602-1606.
- Colwell, R.R., Litchfiel, C.D., Vreeland, R.H., Kiefer, L.A., Gibbons. (1979). Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *Int. J. system. Bact.* **29**, pp.379-399.
- Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Vaccaro, De rosa, M. y Scandurra, R. (1991). Extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1189-1196.

Cross, D.G. y Fisher, H.F. (1970). The mechanism of glutamate dehydrogenase reaction. III. The binding of ligands at multiple subsites and resulting kinetic effects. *J. Biol. Chem.* **245**, pp. 2612-2621.

Cross, D.G., McGregor, L.L. y Fisher, H.F. (1972). The binding of alfa-ketoglutarate in a binary complex and in a ternary complex with NADP by L-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **289**, pp.28-36.

Cheng k.H. y Lepock J.R. (1992). Inactivation of calcium uptake by EGTA is due to an irreversible thermotropic conformational change in the calcium binding of the Ca-ATPase. *Biochemistry.* **31**, 4074-4080.

Danson M.J. y Hough D.W. (1992). The enzymology of archaeobacterial pathways of central metabolism. *Biochem. Soc. Symp.* **58**, pp. 7-21.

De Médicis, E., Laliberté, J-F. y Vass-Marengo, J. (1982). Purification and properties of pyruvate kinase from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **708**, pp.57-67.

Dean, A.M. y Koshland, D.E.(Jr.) (1993). Kinetic mechanism of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry.* **32**, pp. 9302-9309.

Deng, H., Zheng, J., Sloan, D., Burgner, J. y Callender, R. (1992). A vibrational analysis of the catalytically important C4-H Bonds of NADH bound to lactate or malate dehydrogenase:ground-state effects. *Biochemistry.* **31**, pp.5085-5092.

DiRuggiero, J., Robb, F.T., Jagus, R., Klump, H.H., Borges, K.M., Kessel, M., Mai, X. y Adams, W.W.. (1993). Characterization, cloning, and in vitro expresión of the extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeon, ES4. *J. Biol. Chem.* **268**, pp.17767-17774.

Dixon, M. y Webb, E.C. (1979). Enzyme mechanism. En: "Enzymes". 3ª ed. pp.138-183. Academic Press Inc., New York.

Doolittle, R.F. (1995). Of Archae and Eo:what's in a name?. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **92**, pp. 2421-2423.

Dyall-Smith, M.L. and Doolittle, W.F. (1994). Construction of composite transposons for halophilic Archaea. *Can.J.Microbiol.* **40**, pp.922-929.

Eisenberg, H., Mevarech, M., y Zaccari, G. (1992). Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. En:"Avd. Protein Chemistry".

Engel, P.C. y Dalziel, K. (1969). Kinetics studies of glutamate dehydrogenase with glutamate and norvaline as substrates. Coenzyme activation and negative homotropic interactions in allosteric enzymes. *Biochem. J.* **115**, pp.621-631.

Engel, P.C. y Chen, S.S. (1975). A product-inhibition study of Bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochem. J.* **151**, pp.305-318.

Ertan, H. (1992). The effect of various culture conditions on the levels of ammonia assimilatory enzymes of *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiology.* **158**, pp.42-47.

- Ertan, H. (1992). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. of Microbiology*. **158**, pp. 35-41.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. y Woese, C.R.. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*. **209**, pp.457-463.
- Frieden, C. (1959). Glutamic dehydrogenase. I. The effect of coenzyme on the sedimentation velocity and kinetic behavior. *J. Biol. Chem.* **234**, pp.809-814.
- Frieden, C. (1963) Glutamate dehydrogenase. The relation of enzyme structure to the catalytic function. *J. Biol. Chem.* **238**,(10), pp.3286-3299.
- Fromm, H.J. (1979). Use of competitive inhibitors to study substrate binding order. *Methods in Enzymology*. **63**, pp.467-486.
- Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962) Kinetic studies of the bovine hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* **237**, pp.1661-1667.
- Gandbhir, M., Rasched, I., Marlière, P. y Mutzel, R. (1995). Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt. *Res. Microbiol.* **146**, pp.113-120.
- Gambacorta, A., Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L. y De Rosa, M. (1994). Unique features of lipids of Archaea. *System. Appl. Microbiol.* **16**, pp.518-527.

ekko, K. y Timasheff, S.N. (1981). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry*. **20**, pp.4677-4686.

ibbons, N.E. (1957). The effect of salt concentration on the biochemical reactions of some halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **3**, pp. 249-255.

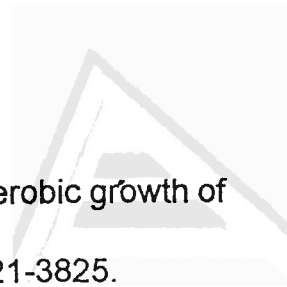
inzburg, M., Sachs, L., y Ginzburg, B. Z. (1971). Referenciado en Mevarech y Neumann, 1977. *J. Membr. Biol.* **5**, pp.78.

onzález-Bravo, M.P. y Maeso, M. (1987). Effect of nitrate and ammonium on nadh-dependent glutamate dehydrogenase activity of detached roots and cotyledons of *Citrullus vulgaris* L. *J.Plant. Physiol.* **127**, pp.331-337.

orisch, H., Hartl, T., Grobebuter, W. y Stezowski, J.J. (1985). Archaeobacterial malate dehydrogenase. The enzymes from the thermoacidophilic organisms *Sulfolobus acidocaldarius* and *Thermoplasma acidophilum* show A-side stereospecificity for NAD⁺. *Biochem. J.* **226**, pp.885-888.

aeffner-Gormley, L., Chen, Z., Howard, Z., y Colman, R. F. (1992). Importance of lysine-286 at the NADP site of glutamate dehydrogenase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*. **31**, pp.7807-7814.

arris, C.E. y Teller, D.C. (1973). Referenciado en Smith, L.D. et al. 1989. *J. Theor. Biol.* **38**, pp.347-362.



artmann R., Sickinger, H.D., y Oesterhelt, D. (1980). Anaerobic growth of halobacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **77**, pp. 3821-3825.

echt, K. y Jaenicke, R. (1989). Malate dehydrogenase from the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. Reconstitution of the enzyme after denaturation and dissociation in various denaturants. *Biochemistry.* **28**, pp.4979-4985.

ga, A. y Cazzulo, J.J. (1975). Some properties of the citrate syntase from the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *Biochem. J.* **147**, pp. 267-274.

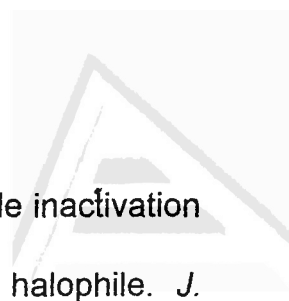
iga, A., Vidal, M.C. y Cazzulo, J.J. (1974). Activation and stabilization of halophilic enzymes by magnesium and calcium ions. *Experientia.* **30**, pp.462-463.

jerten, S. (1959). Calcium phosphate chromatography of normal human serum and electrophoretically isolated serum proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **31**, pp.216-235.

olmes, P.K. y Halvorson, H.O. (1965). The inactivation and reactivation of salt-requiring enzymes from an extreme obligate halophile. *Can. J. Microbiol.* **9**, pp. 904-906.

lornby D.P., y Engel P.C. (1984). Characterization of *Peptostreptococcus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase purified by dye-ligand chromatography. *J. Gen. Microbiol.* **130**, pp. 2385-2394.

lough, D.W. y Danson, M.J. (1989). Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, pp.33-39.



bbard, J.S. y Miller, A.B. (1969). Purification and reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile. *J. Bacteriol.* **99**, pp. 161-168.

Bacteriol. **99**, pp. 161-168.

i, A. (1980). Referenciado en Ragone et al. 1992. *J. Biochem.* (Tokyo)

88, pp.1895-1898.

nicke, R. y Závodszky, P. (1990). Proteins under extreme physical conditions. *FEBS Letters.* **268**, (2), pp.344-349.

nicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**, pp.715-728.

on, J.M. y Iwatsubo, M. (1971). Evidence for two nicotinamide binding sites on L-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Bioph. Res. Com.*

45, (4).

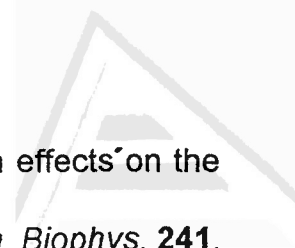
or, B.J. (1988). CO₂ fixation in halobacteria. *Arch. Microbiol.* **149**, pp. 433-441.

z, G., Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A. y Kushner, D.J. (1986). *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **8**, pp.75-79.

oor, M. y Grover, A.K. (1970). Catabolite-controlled regulation of glutamate dehydrogenase of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*

16, 33-40.

ekura, M., Kates, M. (1988). Lipids of halophilic archaeobacteria. En: "Halophilic Bacteria" vol.2, (Ed. F.Rodriguez-Valera) CRC-Press, Florida.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

amlay, M.T., Halvorson, H.R. y Shore, J.D. (1985). Anion effects on the liver alcohol dehydrogenase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, (1), pp. 58-66.

ates, M., Kushwaha, S.C. (1978). Biochemistry of the lipids of extremely halophilic bacteria. En: "Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms", (Eds. S.R. Caplan y M.Ginzburg) pp.461-481. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

auzmann, W. (1959). Referenciado en Gekko y Timasheff 1981. *Adv. Protein Chem.* **14**, pp.31-63.

essel, M., Wildhaber, I., Cohen, S. y Baumeister, W. (1988). Three dimensional structure of the regular surface glycoprotein of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *EMBO J.* **7**, (5), pp.1549-1554.

iriukhin, M.Y., Detkov, S.Y., Baev, M.V. y Tsygankov, Y.D. (1992). NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase from the obligate methylotroph *Methylobacillus flagellatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, pp.155-160.

remecková, H., Svrčula, B. y Mikes, V. (1992). Purification and some properties of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase from *Paracoccus denitrificans*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, pp.1587-1591.

uroda, S., Tanizawa, K., Sakamoto, Y., Tanaka, H., y Soda K. (1990). Referenciado en Haeffner-Gormley et al. 1992. *Biochemistry.* **29**, pp.1009-1015.

- Kushner, D.J. (1968). Halophilic Bacteria. *Advan. Appl. Microbiol.* **10**, pp. 73-99.
- Kushner, D.J. (1985). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: "Microbial Life in Extreme Enviroments". pp. 317-368. Academic Press, New York.
- Leffers, H., Kjems, J., Ostergaard, I., Larsen, N. y Garrett, R.A. (1987). Evolutionary relationships amongst archaebacteria. *J.Mol. Biol.* **195**, pp.13-61.
- LaReau, R.D., y Anderson, V.E. (1992). An Inquiry into source of stereospecificity of Lactate Dehydrogenase using substrate analogues and molecular modeling. *Biochemistry.* **31**, pp.4174-4180.
- Lam, W.L. y Dolittle, W.F. (1989). Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* **86**, pp.5478-5482.
- Lanyi, J.K. y Stevenson, J. (1969). Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase. *J. Bacteriol.* **98**, (2), pp.611-616.
- Lanyi, J.K. y Stevenson, J. (1970). Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria. *J. Biol. Chem.* **245**, (16), pp.4074-4080.
- Lanyi, J.K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, pp. 272-290.
- Larsen, H. (1962). Halophism. En: "The Bacteria." **4**. (Eds. I-C Gunsalus y Stanior, R.Y.). pp. 297-234.



arsen, H. (1967). Biochemical aspects of extreme halophism. *Adv. Microb. Phys.* **1**, pp. 97-131.

arsen, H. (1984). Halobacteriaceae. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology." vol. I, (Eds. N.R. Krieg y J.G. Holt). pp. 261. Williams & Wilkins, Baltimore.

Maire, M., Rivas, E. y Moller, J. (1980). Use of gel chromatography for determination of size and molecular weight of proteins: Further caution. *Anal. Biochem.* **106**, pp. 12-21.

schner, J., y Sumper, M. (1987). The primary structure of a procaryotic glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **262** (20), pp. 9724-9729.

ae, H.B. y Nowak, T. (1992). Influence of pH on the Mn²⁺ Activation of and Binding to Yeast Enolase: A Functional Study. *Biochemistry.* **31**, pp. 2165-2171.

sicht, W., Werber, M.M. y Eisenberg, H. (1978). Purification and characterization of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium* of the Dead Sea. *Biochemistry.* **17**, pp. 4004-4010.

John, H.B., Cameron, L.E., Yangi, B. y Rennie, S.L. (1994). Molecular characterization of an NAD-specific glutamate dhydrogenase gene inducible by L-glutamine. *J. Biol. Chem.* **269**, pp. 4523-4531.

eberman, M.M. y Lanyi, J.K. (1971). Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria. V. Mode of action of salts on cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **245**, pp. 21-33.

López-García, P., Abad, J.P., Smith, C. y Amils, R. (1992). Génomic organization of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: physical map of the chromosome. *Nucleic Acids Res.* **20**, (10), pp.2459-2464.

Loulakakis, K.A. y Roubelakis-Angelakis, K.A. (1992). Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by de-novo synthesis of the alfa-subunit. *Planta.* **187**, pp.322-327.

Mancinelli, R.L. y Hochstein, L.I. (1986). The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, pp. 55-58.

Maras, B., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., De Rosa, M., Bossa, F., Scandurra, R., y Barra, D. (1992). The protein sequence of glutamate dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*, a thermoacidophilic archaeobacterium. *Eur. J. Biochem.* **203**, pp. 81-87.

Matthews, B.W. (1993). Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, pp.139-160.

Matthews, B.W., Grutter, M.G., Anderson, W.F. y Remington, S.J. (1981) Referenciado en Rao y Argos (1981). *Nature*(London). **290**, pp.334-335.

Matveeva, N.I., Nikolaev, Y.A., Voroina, N.A., Plakunov, V.K. (1987). Some principles of the energetics of amino acid transport in extremely halophilic bacteria. *Microbiology.* **55**, pp.422-428.

Ma, K., Robb, F.T. y Adams, M.W.W. (1994). Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Appl. and Env. Microbiol.* **60**,(2), pp. 562-568.

McIntire, W.S. (1987). Steady-state kinetic analysis for the reaction of ammonium and alkylammonium ions with methylamine dehydrogenase from bacterium W3A1. *J. Biol. Chem.* **262**, pp. 11012-11019.

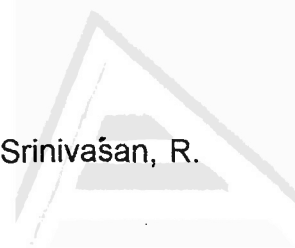
Merkler, D.J., Farrington, G.K. y Wedler, F.C. (1981) Referenciado en Ragone et al. 1992. *Int. J. Pept. Protein Res.* **18**, pp.430-442.

Meshner, M.F. y Strominger, J.L. (1976). Structural (shape maintaining) role of the cell surface glycoprotein of *Halobacterium salinarium*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **73**, pp.2687-2691.

Mevarech, M. y Neumann, E. (1977). Malate dehydrogenase isolated from extremely halophilic bacteria of the dead sea. 2. Effect of salt on the catalytic activity and structure. *Biochemistry.* **16**, pp. 3786-3792.

Mevarech, M., Leicht, W y Werber, M.M. (1976). Hydrophobic chromatography and fractionation of enzymes from extremely halophilic bacteria using decreasing concentration gradients of ammonium sulfate. *Biochemistry.* **15**, pp. 2383-2387.

- Muriana, F.J.G., Alvarez-Ossorio, M.C. y Relimpio, A.M. (1991). Purification and characterization of aspartate aminotransferase from the halophile archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *Biochem. Journal.* **278**, pp.149-154.
- Neumann, P., Markau, K. y Sund, H. (1976). Studies of glutamate dehydrogenase. Regulation of glutamate dehydrogenase from *Candida utilis* by a pH and temperature-dependent. *Eur. J. Biochem.* **65**, pp. 465-472.
- Norberg, P., Kaplan, J.G. y Kushner, D.J. (1973). Kinetics and regulation of the salt-dependent aspartate transcarbamylase of *H.cutirubrum*. *J. Bacteriol.* **113**, pp. 630-686.
- Nuiry, I.I., Hermes, J.D., Weiss, P.M., Chen, CH-Y. y Cook, P.F. (1984). Kinetic mechanism and location of rate determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*. *Biochemistry.* **23**, pp. 5168-5175.
- Ohshima, T. y Nishida, N. (1994). Purification and characterization of extremely thermo-stable glutamate dehydrogenase from a hypertermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *Biocatalysis.* **11**, pp.117-129.
- Ohshima, T. y Sakuraba, H. (1986). Purification characterization of malate dehydrogenase from the phototrophic bacterium, *R.capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta.* **869**, pp. 171-177.
- Ozols, J. (1990) Amino Acid Analysis. *Methods in Enzymology.* **182**, pp. 587-601.



Pahlich, E., Gelleri, B. y Kindt, R. (1978). Referenciado en Srinivaśan, R. (1991). *Planta*. **138**, pp. 161-165.

Pamula, F. y Wheldrake, J.F. (1991). The NAD-Dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*: purification y propiedades. *Arch. Biochem. Biophys.* **291**(2), pp. 225-230.

Park, S-H., Kiick, D.M., Harris, B.G. y Cook, P.F. (1984). Kinetic mechanism in the direction of oxidative decarboxylation for NAD-malic enzyme from *Ascaris suum*. *Biochemistry*. **23**, pp. 5446-5453.

Pawelczyk, T., Easom, R.A. y Olson, M.S. (1992). Effect of ionic strength and ph on the activity of pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, (1), pp.44-49.

Payot, P. (1976). Referenciado en Schmid, F.X. (1989). *Eur. J. Biochem.* **16**, pp.263.

Pfeifer, F. (1988). Genetics of halobacteria. Cap. 11. En: "Halophilic Bacteria", Vol.II. (Ed. F.Rodríguez-Valera). CRC Press Florida.

Pimenov, N.V., Severina, L.O., Plakunov, V.K. (1987). Glucose and galactose utilization by extreme halophiles during their growth and pigment production. *Microbiology*. **55**, pp.271-276.

Porter, D.J.T. y Spector, T. (1993). Dihydropyrimidine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **268**,(26), pp. 19321-19327.

Pundak, S. y Eisenberg, H. (1981). Enzymatic activity and stability of halophilic malate dehydrogenase in relation to hydration and interaction with salts. *Studia Biophysica*. **84**, pp. 29-30.

Magone, R., Facchiano, F., Cacciopuoti, G., Porcelli, M., y Colóma, G.

(1992). Efecto of temperature on the propylamine transferase from

Sulfolobus solfataricus, an extreme thermophilic archaeobacterium.

Eur. J. Biochem. **204**, pp. 483-490.

Rao, J.K.M. y Argos, P. (1981). Structural stability of halophilic proteins.

Biochemistry. **20** , pp.6536-6543.

Rife, J.E. y Cleland, W.W. (1980). Kinetic mechanism of glutamate

dehydrogenase. *Biochemistry.* **19**, pp. 2328-2333.

Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1980)

Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous

cultures. *Can. J. Microbiol.* **26**, pp. 1259-1263.

Rodríguez-valera, F., Juez, G. y Kushner, D.J. (1983). *Halobacterium*

mediterranei spec. nov., a new carbohydrate utilizing extreme

halophile System. *Appl. Microbiol.* **4**, pp. 369-381.

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., and Imhoff, J.F. (1985).

Variation of enviromental features and microbial populations with salt

concentrations in a multi-pond saltern. *Microb. Ecol.* **11**, pp.107-115.

Rodríguez-Valera, F. (1988). Characteristics and microbial ecology of

hypersaline environments. En: "Halophilic Bacteria." vol. I, (Ed.

F.Rodríguez-Valera), pp. 4-27, CRC Press, Florida.

Rossmann, M.G., y Argos, P. (1978). Referenciado en Rao y Argos 1981.

Mol. Cell. Biochem. **21**, pp.161-182.

Ross, H.N.M. y Grant, W.D. (1985). Nucleic acid studies on halophilic

archaeobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**, pp. 165-173.

Sahagun, N. (1988). Mecanismo cinético de la L-alanina deshidrogenasa de *H.halobium*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.

Schmid, F.X. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. En: "Protein structure a practical approach" (1989). (Edited by Creighton, T.E.), pp.251-285. IRL-PRESS at Oxford University Press. .

Schobert, B. (1992). The binding of a second divalent metal ion is necessary for the activation of ATP hydrolysis and its inhibition by tightly bound ADP in the ATPase from *Halobacterium saccharovorum*. *J. Biol. Chem.* **267**, (15), pp. 10252-10257.

Schrimsher, J.L. y Taylor, K.B. (1984). Octopine dehydrogenase from *Pecten maximus*: Steady-state mechanism. *Biochemistry.* **23**, pp. 1348-1353.

Segel, I.H. (1975). Enzymes kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley, New York.

Simsek M., Dassarma S., Rajbhandarg U.L. and Khorana H.G. (1982) A transportable element from *Halobacterium halobium* which inactivates the bacteriorhodopsin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **79**, pp.7268-7272.

Smith, E.L. (1986). Evolution of the structure and function of glutamate dehydrogenase. *Multidomain Proteins.* pp. 35-48.

- Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. y Nyc, J.F. (1975). Glutamate dehydrogenase. En: "The Enzyme". 11A. (Ed. P.D. Boyer) pp. 293-367. 3rd ed. Academic Press. New York.
- Smith, M.T. y Emerich, D.W. (1993). Alanine dehydrogenase from *Soybean Nodule Bacteroids*. Kinetic mechanism and pH studies. *J. Biol. Chem.* **268**,(15), pp. 10746-10753.
- Snedecor, B., Chu, H. Chen, E. (1991). Selection, expresión, and nucleotide sequencing of the glutamate dehydrogenase gene of *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *J. Bacteriol.* **173**,(19) pp. 6162-6167.
- Srinivasan, R. (1991). Characterization of the general anion-binding site in glutamate dehydrogenase-NADPH complex. *Biochim. Biophys. Acta.* **1073**. pp.18-22.
- Stalikaws, C.D., Karayannis, M.I. y Tzouwara-Karayanni, S.M. (1994). Flow injection determination of glutamate in human serun and rat brain samples with immobilized glutamate oxidase and glutamate dehydrogenase reactors. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **32**, pp.767-772.
- Stellwagen, E. (1990). Chromatography on immobilized reactive dyes. *Methods in Enzymology.* **182**, pp. 343-357.
- Strambini, G.B., Cioni, P., y Puntoni, A. (1989). Relationship between the conformation of glutamate dehydrogenase, the state of association of its subunit, and catalytic function. *Biochemistry.* **28**, pp.3808-3814.

- Subov, N.N. (1931). Oceanographical tables. U.S.S.R. Ocean. Inst. Hydrometeorol. Commun. Moscow.
- Sumper, M. (1989). Halobacterial glycoproteins: Genes, biosynthesis and function. En: "Modern aspects in halophilism". The Twelfth Edmond de Rothschild School in Molecular Biophysics. Rehovot. Israel .
- Sund, H. (1968). The pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. En: "Biological Oxidations." (Ed. T.P. Singer) pp. 641-705. John Wiley, Mew York.
- Syed, S.E.-H., Engel, P.C. y Parker, D.M. (1991). Funtional studies of a glutamate dehydrogenase with known three-dimensional structure: steady-state kinetics of forward and reverse reactions catalysed by the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1115**, pp. 123-230
- Tan, M.Q., Ando, S., Yamada, S. y Hayashi, S. (1992). The trypsin-catalyzed activation of glutamate dehydrogenase purified from Eel Liver. *J.Biochem.* **111**, pp.655-661
- Tindall, B.J., Ross, H.N.M. y Grant, W.D. (1984). *Natronobacterium* gen.nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkalophilic archaebacteria. *System.Appl.Microbiol.* **5**, pp.41-57.
- Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. y Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System Appl. Microbiology.* **8**, pp. 89-99.

Vettakkorumakankav, N., Danson, M.J., Hough, D.W. y Stevenson, K.J.

(1992). Dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*: characterization and N-terminal sequence *Biochem. Cell Biol.* **70**, pp. 70-75.

Vierula, P.J. y Kapoor, M. (1985). A study of derepression of NAD-specific

glutamate dehydrogenase of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, pp. 907-915.

Villa, A., Zecca, L., Fusi, P., Colombo, S., Tedeschi, G. y Tortora, P.

(1993). Structural features responsible for kinetic thermal stability of a carboxypeptidase from the archaeobacterium *sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* **295**, pp.827-831.

Viola, R.E. y Cleland, W.W. (1982). Initial velocity analysis for terreactant

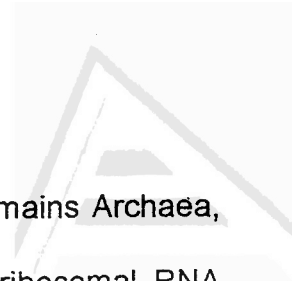
mechanisms. *Methods in Enzymology.* **87**, pp. 353-366.

Werber, M.M., Mevarech, M., Leicht, W. y Eisenberg, H. (1978).

Structure-function relationships in proteins and enzymes of *Halobacterium* of the dead-sea. Energetics and structure of halophilic microorganisms. (Eds. S.R. Caplan y M. Ginzburg) pp. 427-445. Elsevier, New York.

Wierenga, R.K., De Maeyer, M.C.H., y Hol, W.G.J. (1985). Interaction of

pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins Haeffner-Gormley et al. 1992. *Biochemistry.* **24**, pp.1346-1357.



- Winker, S. y Woese, C.R. (1991). A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *System. Appl. Microbiol.* **14**, pp. 305-310.
- Winnacker, E.L. y Barker, H.A. (1970). Purification and properties of a NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium* SB4. *Biochim. Biophys. Acta.* **212**, pp. 225-242.
- Woese, C.R. y Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, pp.5088-5090.
- Woese, C.R. y Olsen, G.J. (1986). Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *System. Appl. Microbiol.* **7**, pp.161-177.
- Woese, C.R., kandler, O. y Wheelis, M.I. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, pp. 4576-4579.
- Wollenberger, U., Schubert, F. Pfeiffer, D. y Scheller, F.W. (1993). Enhancing biosensor performance using multienzyme systems. *Tibtech.* **11**, pp.255-262.
- Wondrak, E.M., Louis, J.M. y Oroszlan, S. (1991). The effect of salt on the Michaelis Menten constant of the HIV-1 protease correlates whit Hofmeister series. *FEBS.* **280**, (2), pp.344-346.
- Yang, B. y LéJohn, H.B. (1994). NADP⁺-activable, NAD⁺-specific Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **269**, (6), pp. 4506-4512.
- You, K. (1982). Stereospecificities of the pyridine nucleotide-linked enzymes. *Methods in Enzymology.* **87**, pp. 101-126.



Zaccai, G. y Eisenberg, H. (1990). Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. *TIBS* .**15**.

Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N. y Eisenberg, H. (1989). Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **208**, pp.491-500.

Zaccai, G., Wachtel, E. y Eisenberg, H. (1986). Referenciado en Zaccai y Cendrin 1989. *J. Mol. Biol.* **190**, pp.97-106.

Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Bock, A., Gropp, F., Rettenberger, M. y Lutz, S. (1985). Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature*. **313**, pp.789-791.

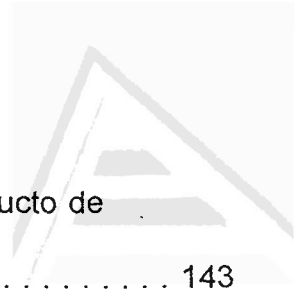


APENDICE I

Indice de tablas.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla I.1: Especificidad de coenzima en GDH	34
Tabla ME.1: Preparación gel separador electroforesis	58
Tabla ME.2: Preparación gel concentrador	58
Tabla C.1: Efecto distintas fuentes de nitrógeno	71
Tabla C.2: Efecto distintas fuentes de nitrógeno con interrupción de cultivo	70
Tabla C.3: Efecto distintas fuentes de Carbono.	72
Tabla P.1: Resultados purificación.	81
Tabla M.1: Patrones de inhibición por producto.	118
Tabla M.2: Patrones de inhibición por análogos de sustrato.	120
Tabla M.3: Mecanismos cinéticos GDH de distintas fuentes.	126
Tabla M.4: Concentraciones estudio velocidades iniciales	128
Tabla M.5: Anal. repres. 2 ^{arias} y 3 ^{arias} de los patrones de velocidad inicial	130
Tabla M.6: Concentraciones estudio inhibición por producto.	131
Tabla M.7: Concentraciones e inhibidores competitivos, estudio de inhibición por análogos de sustrato.	132
Tabla M.8: Comparación ajuste por mínimos cuadrados de la ecuación de velocidad	141



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

· Tabla M.9: Constantes cinéticas y de inhibición por producto de GDH <i>Hf.mediterranei</i>	143
Tabla M.10: Constantes de inhibición análogos de sustrato	146
Tabla M.11: Patrones de inhibición en un sistema ordenado con etapas de equilibrio rápido.	149
Tabla pH.1:Cte. cinéticas para el sustrato NADP a diferentes pHs	155
Tabla pH.2:Cte. cinéticas para el sustrato α -KG a diferentes pHs . .	156
Tabla pH.3:Cte. cinéticas para el sustrato amonio a diferentes pHs	157
Tabla pH.4:Valores de pK para NADP-GDH	161
Tabla PM.1:Pesos moleculares de GDH de diversas fuentes	164
Tabla AA.1: Longitudes de onda de absorción y emisión	177
Tabla AA.2:Composición aminoacídica de NADP-GDH <i>Hf.mediterranei</i>	183
Tabla AA.3:Comparación de la composición de aa de GDH de diversas fuentes.	185



APENDICE II

Abreviaturas:

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

AEE	actividad enzimática específica
AMP	Adenosin monofosfato
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
DTT	ditiotreitól
DEAE-celulosa	dietilaminoetil-celulosa
EDTA	Etilen diamino tetraacético ácido
E_a	energía de activación
E_{aapp}	energía de activación aparente
E_{ades}	energía de activación del proceso de desnaturalización
E_{acatal}	energía de activación de la catálisis.
GDH	glutamato deshidrogenasa
GDHs	glutamato deshidrogenasas
GTP	guanósin trifosfato
GndCl	Clorhidrato de guanidina
GLK	glutarato
GS/GOGAT	glutamina sintetasa y glutamato sintasa)
HA	hidroxilamina
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
ISH	elementos de inserción halofílicos



2-KG	2-oxoglutarato
α -KG	2-oxoglutarato
3-MPA	3-metil-oftaldehido
NAD ⁺	nicotin adenin dinucleotido oxidado
NADP ⁺	nicotin adenin dinucleotido fosfato oxidado
NADH	nicotin adenin dinucleotido reducido
NADPH	nicotin adenin dinucleotido fosfato reducido
NADP-GDH	glutamato deshidrogenasa NADP-específica
NAD-GDH	glutamato deshidrogenasa NAD-específica
NAD(P)-GDH	glutamato deshidrogenasa que actua con ambos coenzimas
OPA	orto-oftaldehido.
PHB	poli- β -hidroxibutirato
PG	glicerol fosfato
PGS	fosfato glicerol sulfato
PGP	fosfato glicerol fosfato
PGP-Me	PGP monometilado
PVDF	difluoruro de Polivinilideno.
R _f	distancia recorrida relativa
SDS	dodecil sulfato sódico
TCA	tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenetilen diamina