

5-. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1-. PURIFICACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS.

5.1.1-. EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES NAS Y NiR ASIMILATIVAS DURANTE EL DESARROLLO DEL CULTIVO (MEDIO MÍNIMO 100 mM KNO₃).

Tras los estudios fisiológicos de asimilación del nitrógeno en *Haloferax mediterranei*, se ha observado que la duración de la incubación del cultivo es de suma importancia para la expresión de las actividades Nas y NiR asimilativa (apartado 4). Si se quiere detectar dichas actividades, la densidad óptica de los medios debe ser aproximadamente 1,3 (600 nm), momento en que el cultivo se encuentra en la mitad de la fase exponencial y no ha tenido lugar la excreción de NO₂⁻ al medio. Durante la fase exponencial, también llamada *fase logarítmica de crecimiento*, el crecimiento de la población queda definido por la expresión:

$$Z = Z_0 \times 10^{K(t-t_0)/2,303}$$

donde K es la constante de velocidad de crecimiento, y Z y Z₀ corresponden a la cantidad de cualquier componente microbiano del cultivo en los tiempos t y t₀, respectivamente.

En esta fase, cabe esperar que la síntesis de enzimas implicadas en el crecimiento de la biomasa sea máxima. Si las actividades Nas y NiR asimilativas, están implicadas en la síntesis de aminoácidos que constituyen las proteínas, su expresión será máxima durante la fase exponencial.

La fase exponencial no se mantiene indefinidamente, ya que el crecimiento de la población de *Haloferax mediterranei*, al igual que ocurre en el resto de microorganismos, está limitado normalmente por el agotamiento de nutrientes disponibles o por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia, la velocidad de crecimiento disminuye llegando a detenerse. En este punto del crecimiento se dice que el cultivo está en la *fase estacionaria*. La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un período de crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. El cultivo de *Haloferax mediterranei* nunca debe llegar a esta fase, si se quiere purificar Nas y NiR asimilativa en condiciones óptimas para la expresión de ambas enzimas. Con el fin de interrumpir el crecimiento en el momento adecuado, se hizo un seguimiento del mismo mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm (figura 4.1, pág 44).

Como se ha detallado en el apartado 4.2.1 (pág 43), la actividad NiR es máxima en la mitad de la fase exponencial, precedida de la actividad Nas.

Así mismo se realizó un seguimiento de la excreción de NO_2^- (figura 4.2, pág. 44) al medio de cultivo, encontrando que dicha excreción se inicia cuando el cultivo supera la mitad de la fase exponencial, siendo máxima en la fase estacionaria del crecimiento celular. La excreción de NO_2^- coincide con la pérdida de las actividades Nas y NiR asimilativas.

En resumen, para purificar en condiciones óptimas las Nas y NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*, las células deben cosecharse a mitad de la fase exponencial, antes de que comience la excreción de NO_2^- al medio.

5.1.2-. PURIFICACIÓN DE LA NITRATO REDUCTASA ASIMILATIVA (Nas).

Etapa 1. Cromatografía en Sepharosa-4B. Como se ha citado en materiales y métodos (pág. 32), ésta fue la primera etapa del proceso de purificación y en las fracciones de elución se hallaron dos actividades: Nas y NiR asimilativas.

A partir de esta cromatografía se han desarrollado dos procesos de purificación (uno para la Nas y otro para la NiR asimilativa).

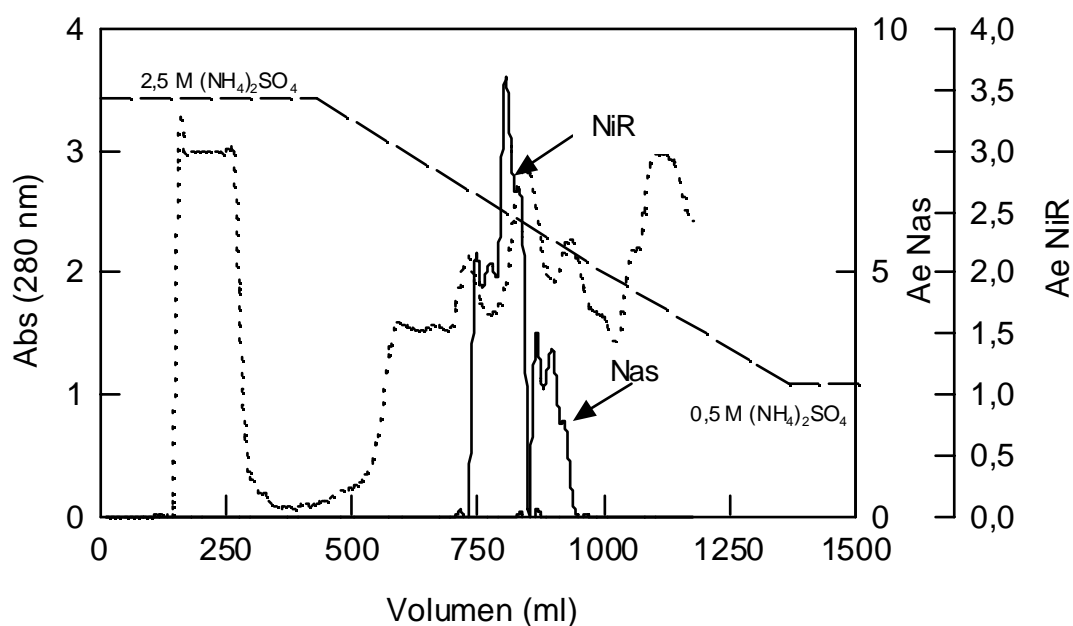


Figura 5.1. Cromatograma de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia a 280 nm (...), el perfil de actividades (___), así como el gradiente del tampón empleado para la elución (- - -). Las actividades Nas y NiR se expresan en (mU/mg proteína).

Etapa 2. Cromatografía en DEAE-celulosa. Tras el primer paso del proceso de purificación, se realizó una cromatografía en DEAE-celulosa cuyo cromatograma se recoge en la figura 5.2.

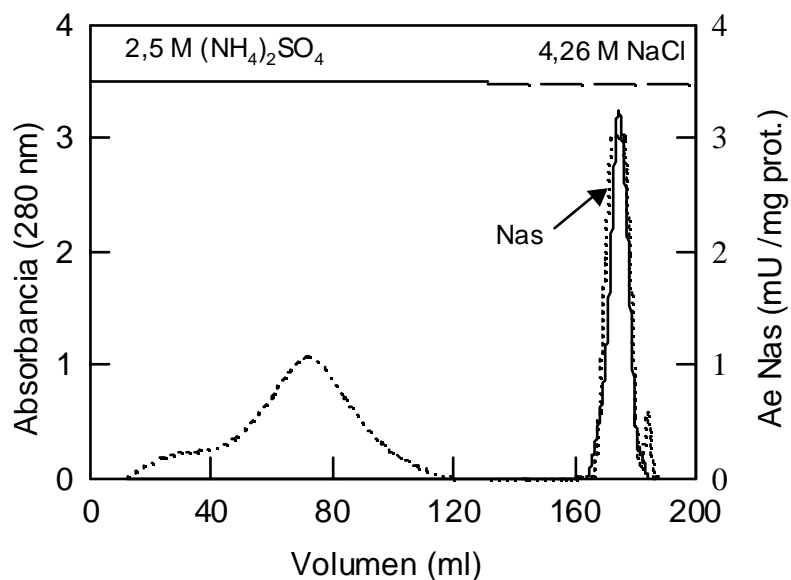


Figura 5.2. Cromatograma de DEAE-celulosa correspondiente a las fracciones con actividad Nas procedentes de la columna de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia (...) y el perfil de actividad Nas (—). Las líneas continua y discontinua de la parte superior del cromatograma, hacen referencia a los tampones empleados.

Las fracciones que presentaban actividad Nas tenían color marrón. Si este color es debido a la presencia de dicha enzima, podría indicar que en la estructura de ésta se encuentran grupos FAD, grupos hemo o bien grupos Fe-S (apartado 5.2.2.i, pág. 109).

Etapa 3. Cromatografía en Sephacryl S-300. Las fracciones con actividad Nas obtenidas en el anterior paso se utilizaron para la cromatografía en Sephacryl S-300, cuyo cromatograma aparece en la figura 5.3.

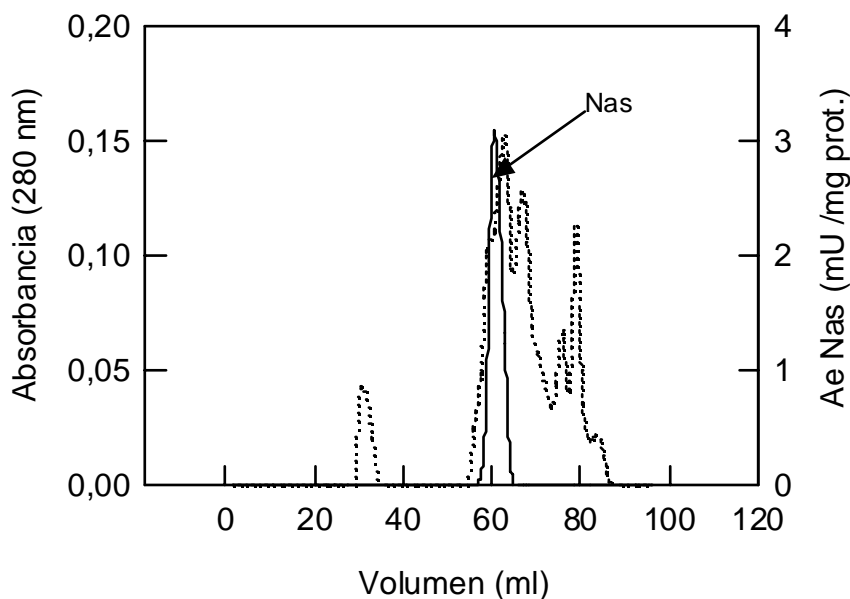


Figura 5.3. Cromatograma de Sephacryl S-300 correspondiente a las fracciones con actividad Nas procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (...) y el perfil de actividad específica Nas (___).

El peso molecular estimado para la Nas mediante esta columna cromatográfica es $132 \text{ kDa} \pm 6 \text{ kDa}$. Tras esta etapa de purificación, la pérdida de actividad fue considerable. Con el fin de recuperar al menos parte de la actividad que la muestra tenía antes de pasarla por esta columna, se dializó frente a 200 volúmenes de tampón B (4,3 M NaCl). Como es sabido, las enzimas de arqueas halófilas no son estables cuando la concentración de sal del medio en que se encuentran es baja. También se puede perder actividad dependiendo del tipo de sal presente en el medio (Zaccai y Eisenberg, 1990). El tampón empleado

en la columna de Sephacryl S-300 para eluir la muestra contiene 2 M NaCl, por lo que es posible que la enzima pierda actividad con este tampón, debido a la baja concentración de sal.

Fracción	[prot.] mg/ml	Vol. (ml)	Actividad total (U)	A_e	f_p	R (%)
Extracto crudo	7,00	124	2,65	3,10	1,0	100
Sepharosa-4B	2,20	59	0,40	3,08	1,0	15
DEAE-celulosa	2,50	8	0,11	5,50	1,8	4
Sephacryl S-300	0,40	1	0,22	550	177,0	8

Tabla 5.1. Tabla resumen del proceso de purificación de la Nas. La actividad enzimática total se expresa en unidades ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{formados min}^{-1}$). f_p es el grado de purificación, **R(%)** el rendimiento y A_e la actividad específica expresada en mU/mg proteína.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Tras realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se obtuvo el gel cuya imagen se presenta en la figura 5.4.

Las proteínas empleadas como patrones fueron: fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (42,7 kDa), aldolasa (40,0 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa). La concentración de proteína cargada en cada calle fue 30 μg aproximadamente.

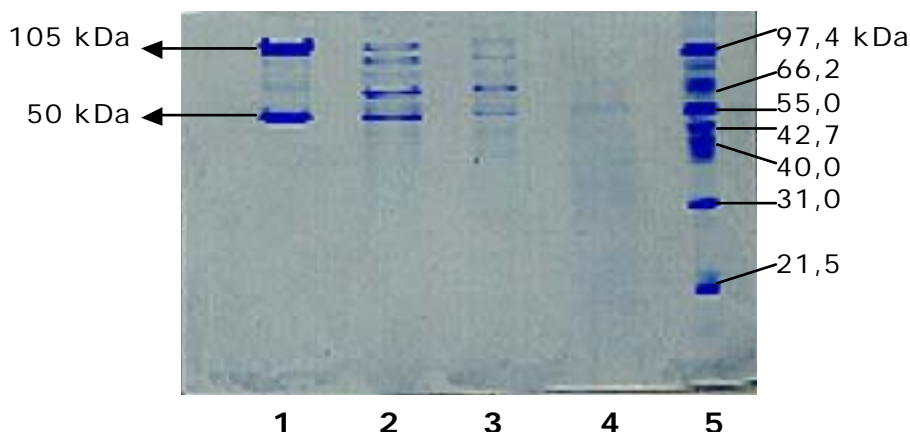


Figura 5.4. SDS-PAGE correspondiente al proceso de purificación de la Nas. Calle 1: Sephacryl S-300; Calle 2: DEAE-celulosa; Calle 3: Sepharosa-4B; Calle 4: extracto crudo y Calle 5: patrones.

Como puede observarse, aparecen dos bandas: una de 105 kDa y otra de 50 kDa. Debemos tener presente que la SDS-PAGE sobreestima el peso molecular de las proteínas obtenidas de halófilos debido a la considerable presencia de aminoácidos ácidos (Inatomi y Hochstein, 1996); de ahí que el peso estimado empleando cromatografía de tamizado molecular (Sephacryl S-300) sea más preciso (132 ± 6 kDa).

Se han purificado un gran número de NR no asimilativas a partir arqueas halófilas. NR heterodimérica (116 y 69 kDa) en *Haloferax denitrificans* (Hochstein y Lang, 1991); NR heterotrimérica (100, 60 y 31 kDa) procedente de *Haloferax volcanii* (Bickel- Sandkötter y Ufer, 1995), y homotetrámero (63 kDa) a partir de células de *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu *et al.*, 2000). Estas diferencias podrían extenderse de igual forma entre las Nas en este dominio, como ocurre en bacterias (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

5.1.3-. PURIFICACIÓN DE LA NITRITO REDUCTASA ASIMILATIVA (NiR).

Etapa 1. Cromatografía en Sepharosa-4B. Tras la cromatografía en Sepharosa-4B (figura 5.1, pág 86), aquellas fracciones que presentaban actividad NiR se unieron para ser introducidas en una columna de DEAE-celulosa.

Etapa 2. Cromatografía en DEAE-celulosa. Después de proceder según se indica en materiales y métodos (página 32), se obtuvo el cromatograma que se recoge en la figura 5.5. Las fracciones con actividad NiR constituyeron la muestra que se introdujo seguidamente en la columna de Q-Sepharosa.

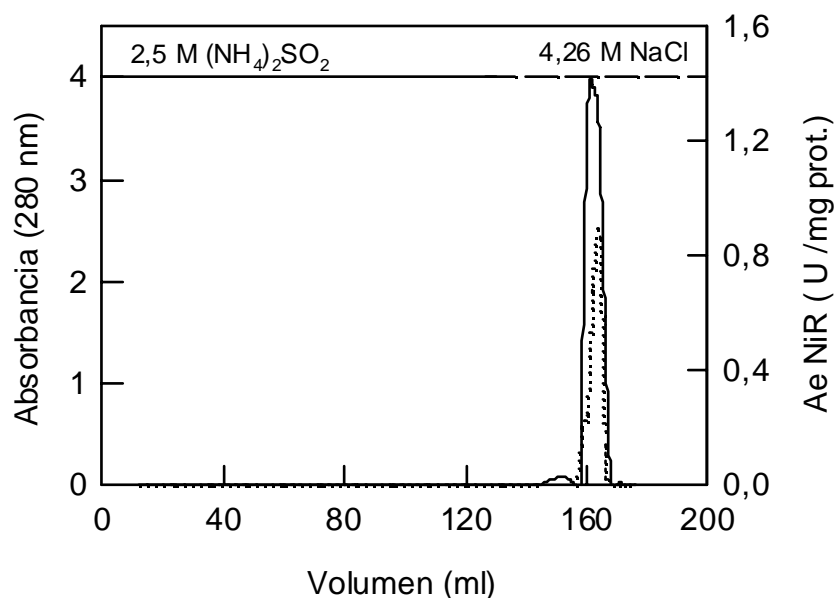


Figura 5.5. Cromatograma de DEAE-celulosa correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia (...) y el perfil de actividad NiR (___). Las líneas continua y discontinua que aparecen en la parte superior del cromatograma, hacen referencia a los tampones empleados.

Etapa 3. Cromatografía en Q-Sepharosa. El paso de las fracciones con actividad NiR por esta columna proporcionó el siguiente cromatograma:

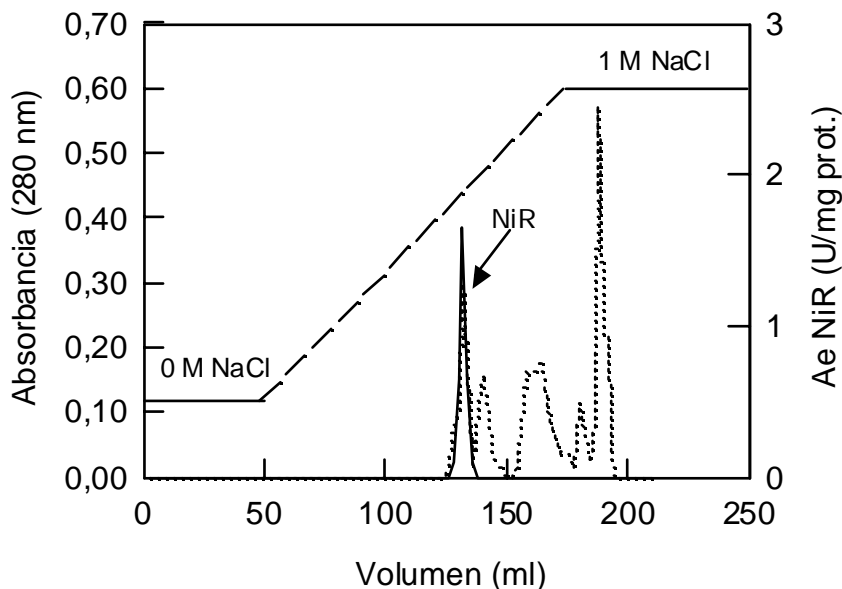


Figura 5.6. Cromatograma de Q-Sepharosa correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (...) y el perfil de actividad NiR (—), así como el gradiente del tampón empleado para la elución.

Fracción	[prot.] mg/ml	Vol. (ml)	Actividad total (U)	A_e	f_p	R (%)
Extracto crudo	7,76	30,0	80,08	0,34	1,0	100
Sepharosa-4B	0,75	38,0	60,62	2,13	6,2	76
DEAE-celulosa	2,21	4,5	22,47	2,26	6,6	28
Q-Sepharosa	0,11	2,0	3,50	15,79	46,0	4

Tabla 5.2. Tabla resumen del proceso de purificación de la NiR. La actividad enzimática total se expresa en unidades ($\mu\text{moles NO}_2^-$ descompuestos min^{-1}). f_p es el grado de purificación, $R(\%)$ el rendimiento y A_e la actividad específica expresada en U/mg proteína.

Parte de la muestra con actividad NiR procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa se introdujo en la columna de Sephacryl S-300 con el fin de estimar el peso molecular de la enzima nativa. El procedimiento llevado a cabo fue el mismo que el descrito para la Nas. La masa obtenida fue de 74 ± 6 kDa.

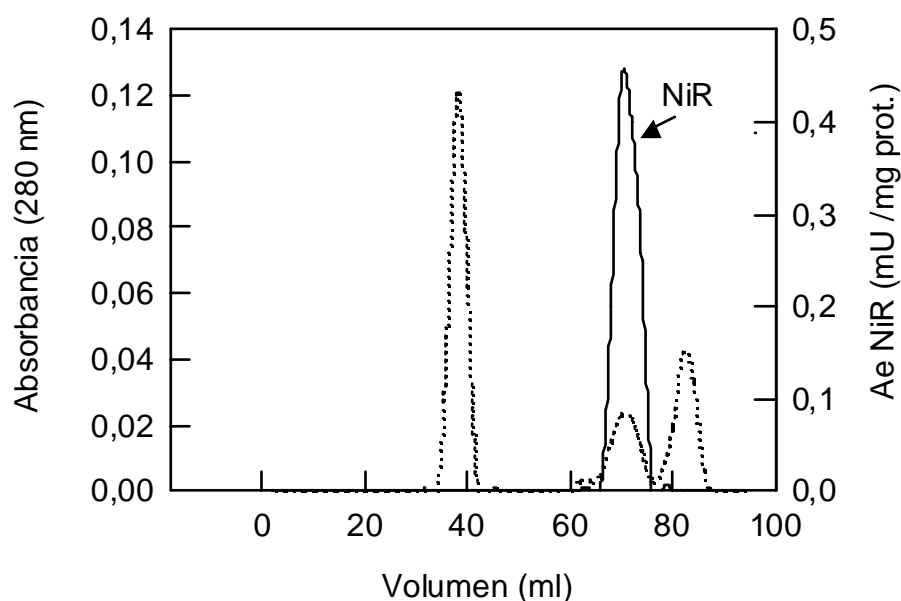
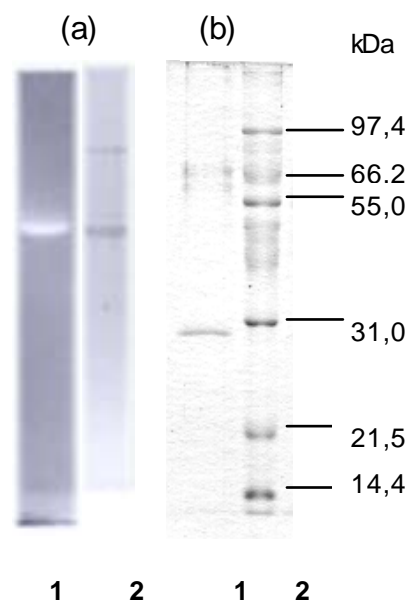


Figura 5.7. Cromatograma de Sephacryl S-300 correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (...) y el perfil de actividad NiR (___). Esta columna se ha empleado únicamente para determinar el peso molecular de la NiR asimilativa. Al utilizarla para purificar la enzima, el rendimiento de la purificación resultaba muy bajo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y nativa. La electroforesis en condiciones nativas de la enzima purificada procedente de la columna de Q-Sepharosa, mostraba dos bandas cuando se teñía con azul Coomassie (figura 5.8 a, calle 2). Sólo una de dichas bandas exhibía actividad NiR (figura 5.8 a, calle 1).

Esta banda fue cortada y sumergida en SDS al 10% durante toda la noche a 40 °C, para extraer la proteína del gel. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la enzima purificada, procedente de la banda del gel nativo, mostraba tres bandas de 30,8 kDa \pm 1,0 kDa, 62,1 \pm 1,0 kDa y 66,5 \pm 1,0 kDa (figura 5.8 b, calle 1). Mediante secuenciación de proteínas hemos demostrado que el péptido de menor peso molecular no corresponde a la NiR, ya que presenta gran homología con NADP⁺ reductasas dependientes del factor 420 (transportador de electrones de bajo potencial). Así deducimos que la NiR es un monómero de 66,5 kDa. La segunda banda que aparece en SDS-PAGE (62,1 kDa) podría ser un producto de la degradación del monómero de 66,5 kDa, como ocurre en la NiR no asimilativa de *Haloferax denitrificans* (Inatomi y Hochstein, 1996). El tamaño obtenido de la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* es similar al de otras enzimas asimilativas de organismos no halofílicos (Romero *et al.*, 1987).

Figura 5.8. Geles de electroforesis de la purificación de la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*. (a) Gel de electroforesis nativo: calle 1: tinción de actividad; calle 2: tinción con azul Coomassie. (b) SDS-PAGE: calle 1: NiR purificada a partir de la banda con actividad del gel nativo; calle 2: patrones.



5.2.-. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS.

5.2.1.-. EFECTO DEL DITIONITO SÓDICO EN LA DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DEL NITRITO.

Se ha estudiado como influye la presencia de ditionito sódico (DT) empleado en la reducción del MV, una vez oxidado, en la determinación colorimétrica de NO_2^- . Para ello se prepararon alícuotas de 1 ml de la mezcla de reacción del ensayo MV-Nas. La mitad de las alícuotas sirvieron para los ensayos en ausencia de DT (alícuotas A) y la otra mitad para los ensayos en presencia de DT (alícuotas B). En ambos casos se añadió NO_2^- , a diferentes concentraciones, a las alícuotas (por duplicado). Todas las alícuotas se sumergieron en un baño a 60 °C (temperatura a la que se han realizado los estudios de caracterización), durante 2 minutos, tras los cuales se añadió 17 mM de DT a las alícuotas B. El DT (disuelto en NaHCO_3 0,1 M), se oxidó por agitación inmediatamente después de su adición. Seguidamente se cuantificó el NO_2^- .

Como puede apreciarse en la figura 5.9, la cantidad de NO_2^- detectado en las alícuotas A (ausencia de DT) es la misma que en las alícuotas B (presencia de DT). Blanco Mediavilla (Blanco Mediavilla, 1992) detectó una subestimación de la concentración de NO_2^- en presencia de DT oxidado. Nosotros no hemos observado este efecto cuando la concentración de DT presente en el ensayo era 17 mM.

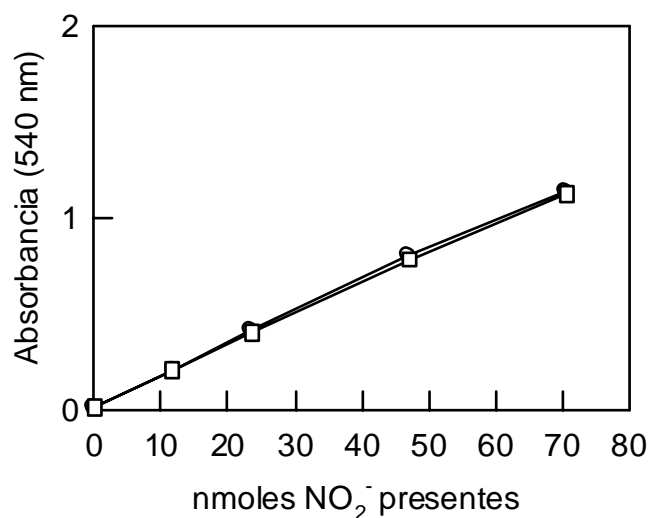


Figura 5.9. Efecto del DT (oxidado) en la determinación colorimétrica del NO₂⁻. (O) Representa las alícuotas A (ausencia de DT). (□) Representa las alícuotas B (presencia de DT).

La única diferencia entre las medidas de Blanco Mediavilla y las nuestras, se encuentra en la concentración de sal presente en las mezclas de reacción: nuestras mezclas tienen concentraciones de NaCl muy elevadas, entre 2 y 4 M, por lo que la eliminación de este efecto del DT, puede ser debido a la gran fuerza iónica presente. El mismo ensayo se realizó con la mezcla de reacción empleada en las medidas de actividad MV-NiR, encontrando que el DT oxidado tampoco interfiere en la cuantificación del NO₂⁻, en este caso (tabla 19 del apéndice de tablas).

5.2.2-. CARACTERIZACIÓN DE LA NAS DE HALOFERAX MEDITERRANEI.

Los estudios de caracterización se realizaron con las fracciones procedentes de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que la proteína estaba muy concentrada y la pureza era considerable.

5.2.2.a. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas.

En el ensayo de la actividad MV-Nas (figura 5.10), se aprecia que la producción de NO_2^- (ascenso del valor de la Abs. a 540 nm) aumenta de forma lineal con la cantidad de Nas purificada presente en el ensayo.

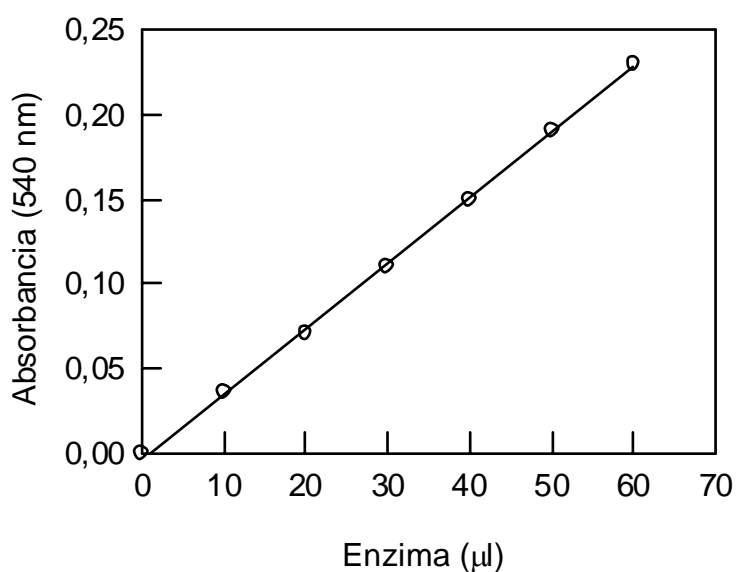


Figura 5.10. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,5 mg/ml, la concentración de proteína.

5.2.2.b. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas.

Además de estudiar el efecto de la cantidad de enzima presente en el ensayo (figura 5.10), se llevó a cabo un estudio del efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 5.11.

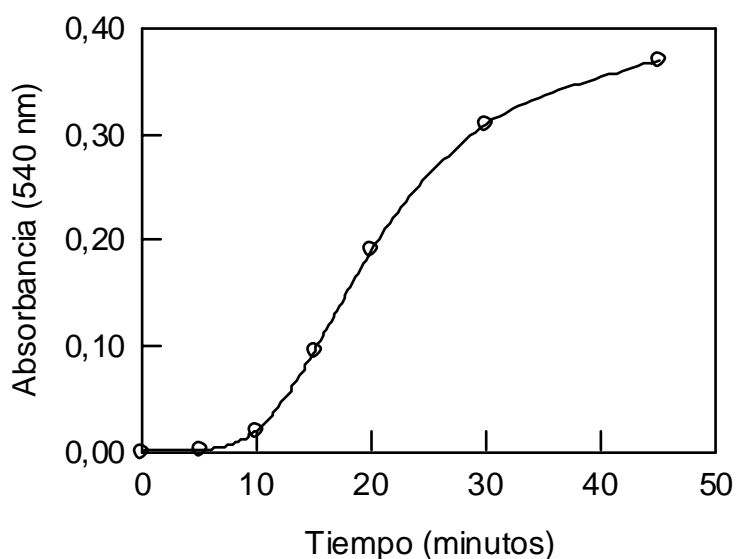


Figura 5.11. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,5 mg/ml, la concentración de proteína.

Como puede apreciarse, la aparición de nitrito (producto de la reacción) presenta un comportamiento sigmoideo con el tiempo de reacción. Durante los 10 primeros minutos, la cantidad de nitrito formado es muy pequeña. Tras este tiempo, hay una aceleración en la producción de nitrito, hasta que desaparece el poder reductor (oxidación completa del MV). Este comportamiento hizo necesario emplear tiempos de incubación de 20 minutos.

5.2.2.c. Efecto del pH sobre la actividad Nas.

Para determinar el pH óptimo de la actividad Nas se usaron dos disoluciones amortiguadoras (apartado 3.2.3, pág 28). Se midieron actividades para cada uno de los valores de pH, a dos temperaturas diferentes: 60 °C, temperatura que favorece la actividad *in vitro* y 40 °C, temperatura más próxima a la temperatura del medio en el que se hallan estas haloarqueas (salinas costeras sometidas a fuertes radiaciones solares).

Existe una variación del valor de pH en función de la temperatura. Dicha variación depende a su vez de la naturaleza de la disolución amortiguadora empleada para realizar los ensayos. Por este motivo, cuando se pretende estimar el valor de pH óptimo para la actividad de una enzima en ensayos que se realizan a temperaturas superiores a 25 °C, el valor de pH debe ser corregido (al valor de pH obtenido se le resta el factor de corrección por cada grado de temperatura superior a 25 °C). Los factores de corrección de pH para las disoluciones amortiguadoras empleadas en este estudio son: 0,031 para el tampón Tris-HCl y 0,009 para el tampón carbonato.

En ningún caso se observó formación espontánea de NO_2^- durante las medidas de actividad Nas. Una vez determinado el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad Nas, se escogió la temperatura de 60 °C y un valor de pH de 9 para las medidas de actividad MV-Nas, por ser condiciones que favorecen la actividad *in vitro*. La dependencia de la actividad específica Nas respecto a diferentes valores de pH, se muestra en las siguientes figuras:

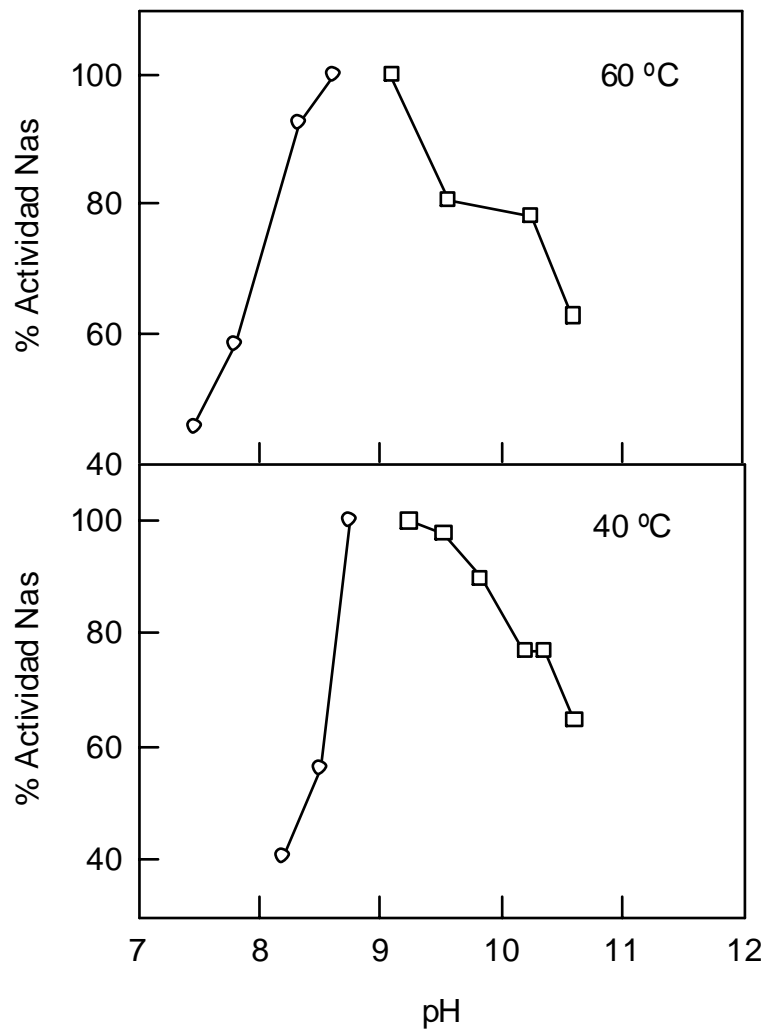


Figura 5.12. Dependencia de la actividad Nas respecto del valor de pH a 60 °C y 40 °C. (O) Medidas de actividad en tampón Tris. (□) Medidas de actividad en tampón carbonato.

En la figura 5.12, se observa que el valor de pH óptimo para la actividad Nas está entorno a 9 para ambas temperaturas. Este primer resultado de caracterización junto con los datos obtenidos de la purificación demuestran que la Nas analizada en el presente estudio es una NR diferente a la purificada por Alvarez-Ossorio a partir de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). Esta última NR presentaba la máxima actividad cuando el pH del medio de reacción era 7,5-7,7.

La mayor parte de Nas purificadas y caracterizadas tienen un pH óptimo superior a 7,5: pH 7,5 para la Nas de una bacteria halotolerante Ba1 (Hochman *et al.*, 1988), pH 8 para la Nas de *Azotobacter vinelandii* (Gangeswaran *et al.*, 1993), pH 10,3 para la Nas de *Rhodococcus* sp. RB1 (Blasco *et al.*, 2001), pH 8 para la Nas de *Phormidium laminosum* en el ensayo Fd-Nas ó pH 10 en el ensayo MV-Nas (Blanco Madiavilla, 1992). Sin embargo, las NR no asimilativas estudiadas tienen valores de pH óptimos que oscilan entre 6,8 y 7,5 (Yamamoto *et al.*, 1986; Blümle y Zumft, 1991).

5.2.2.d. Efecto de la temperatura y la [NaCl] sobre la actividad Nas.

Al igual que el pH, la temperatura y la concentración de sal, también tienen influencia sobre la actividad enzimática, ya que son factores que alteran la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas.

La estabilidad de una proteína depende de las interacciones de ésta con otras proteínas, con las moléculas de agua o con las sales presentes en la disolución en la que se encuentra. Si una proteína es halofílica (generalmente son ricas en aminoácidos ácidos), sólo es estable en una disolución con elevada concentración de sal (Zaccai y Eisenberg, 1990).

En cuanto a la temperatura, la velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa conforme se eleva la temperatura, hasta un cierto valor conocido como *temperatura óptima*, a partir de la cual, la velocidad decrece rápidamente, por rotura de los enlaces no covalentes, relativamente débiles, de la estructura terciaria.

Se ha estudiado cómo varía la actividad Nas de *Haloferax mediterranei* en función de la temperatura, cuando se modifica la concentración de NaCl presente en el ensayo. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 5.13.

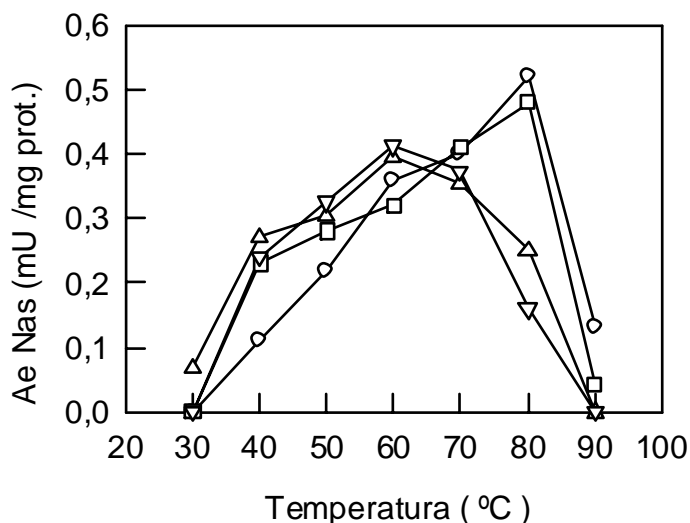


Figura 5.13. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad Nas. (○) 3,1 M NaCl, (□) 2,2 M NaCl, (△) 1,3 M NaCl y (▽) 0,9 M NaCl.

Empleando el tampón a pH 9 (óptimo para la actividad), se observa una fuerte dependencia entre la temperatura y la concentración de NaCl presente en la mezcla de reacción como ya mostrara el grupo de Marquez previamente, para la NiR no asimilativa de *Halobacterium* (Marquez y Brodie, 1973). La máxima actividad se desarrolló a 80 °C para concentraciones de NaCl entre 2,2 y 3,1 M. Si la [NaCl] disminuía (1,3 y 0,9 M NaCl), los valores de actividad más altos se detectaban a 60 °C. La NR no asimilativa purificada a partir de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992) muestra el mismo comportamiento que el observado para la Nas del presente estudio, es decir, el NaCl ejerce un claro efecto protector sobre la

actividad y estabilidad de la enzima en ambos casos. Este patrón es general para todas las enzimas halófilas estudiadas (Zaccai y Eisenberg, 1990).

5.2.2.e. Energías de activación para la actividad Nas.

En la tabla 5.3 se recogen los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la Nas de *Haloferox mediterranei*. Aquellos ensayos en los que la [NaCl] presente era más baja, implicaron una mayor energía de activación.

Pendiente	r^2	Rango de temperatura	[NaCl]	E_a (kJ/mol)
-1,83	0,93	40-80 °C	3,1 M	35
-2,64	0,97	30-60 °C	1,3 M	46

Tabla 5.3. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la Nas de *Haloferox mediterranei*.

Los valores de energía de activación obtenidos son del mismo orden que los descritos para la NR no asimilativa de *Haloferox mediterranei*. En este último caso, se ha visto que la energía de activación más alta se obtiene a partir de ensayos con alta [NaCl], si la temperatura del estudio está entre 30 y 40 °C (89,7 kJ/mol, 3,2 M NaCl frente a 71,4 7 kJ/mol, 1,8 M NaCl). Sin embargo, a temperaturas superiores (50-60 °C), el patrón se invierte, es decir se detectan energías de activación más altas en ensayos con baja [NaCl] (17,5 kJ/mol, 0,6 M NaCl frente a 13,8 7 kJ/mol, 1,2 M NaCl) (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992).

5.2.2.f. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.

La Nas fue incubada (tampón fosfato a pH 7,0) a 4 °C en presencia de diferentes [NaCl]. A lo largo del período de incubación se extrajeron alícuotas para realizar la medida de actividad. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente gráfica:

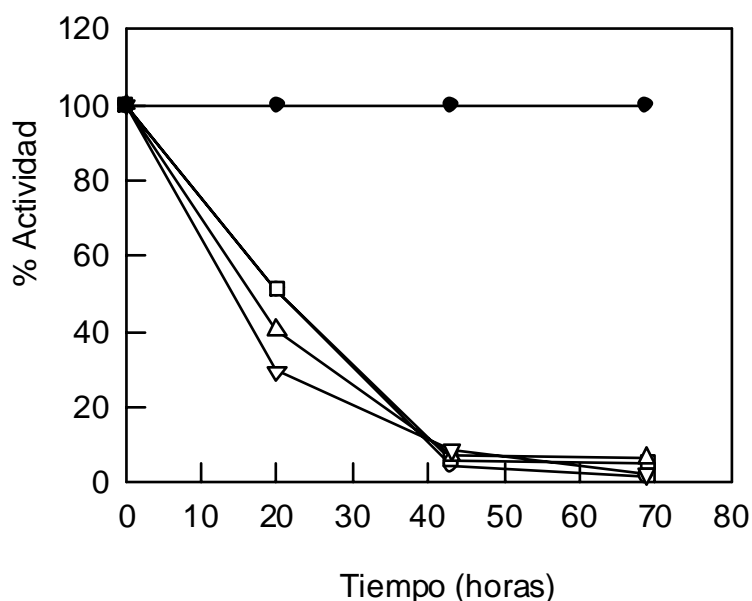


Figura 5.14. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad específica Nas. (●) 4,3 M NaCl, (○) 2,7 M NaCl, (□) 2,1 M NaCl, (Δ) 1,2 M NaCl y (∇) 0,9 M NaCl.

Tras 43 horas de incubación en presencia de 2,7, 2,1, 1,2 y 0,9 M NaCl, se había perdido el 95 % de la actividad, mientras que la enzima permanecía completamente estable después de 90 horas de incubación en presencia de 4,3 M NaCl. Estos resultados vienen a apoyar la hipótesis de que las sales tienen un efecto positivo sobre la estabilidad y la actividad de las enzimas halofílicas (Madigan y Oren, 1999).

5.2.2.g. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad Nas.

Como se desprende de los resultados recogidos en la tabla 5.4, el MV reducido es el mejor donador de electrones (*in vitro*), mientras que el NADH o NADPH no son empleados como tales (*in vitro*). El DT no fue capaz de reducir el NO_3^- en ausencia de MV.

Sistema	Actividad (%)
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV	100,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + sulfito	97,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + pOH-HgBzOH	98,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + Azida	21,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + EDTA	57,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + Cianuro	3,5
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + DPIP	71,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + PMS	99,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + DTT	99,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + MV + KClO_3	94,0
MV + NADH	8,0
MV + NADPH	23,0
NADH	0,6
NADPH	0,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	2,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + PMS	6,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + DPIP	5,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + FAD	8,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ + Fd	94,0

Tabla 5.4. Reducción de NO_3^- en presencia de diferentes cofactores, donadores de electrones e inhibidores. La concentración de los diferentes compuestos fue: 17 mM DT, 4 mM MV, 200 nM Fd y 1 mM para el resto de compuestos. El 100% de actividad específica Nas es 9 mU/mg proteína.

El NADH o el NADPH tampoco son buenos donadores para la Nas de *Azotobacter vinelandii*, así como para la mayor parte de las Nas citoplasmáticas que se han purificado (Gangeswaran *et al.*, 1993). Tampoco la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* emplea NADH ni NADPH como coenzimas (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). En presencia de FAD, se obtuvo el 8% de la máxima actividad Nas de *Haloferax mediterranei*, valor muy similar al obtenido en ensayos de actividad NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (5%) (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). La ferredoxina de este trabajo (apartado 6, pág 130), reducida por DT, fue tan eficiente como el MV en la reducción de NO_3^- , por lo que proponemos que es el donador fisiológico de electrones. De hecho, el empleo de ferredoxina como donador de electrones es una característica propia de Nas, ya que como se citó en el apartado de Introducción (pág. 17), las Nas pueden ser de dos tipos: ferredoxina o flavodoxina dependientes y enzimas dependientes de NAD(P)H; mientras que las NR no asimilativas no son ferredoxina o flavodoxina dependientes (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

En cuanto a los inhibidores, el cianuro inhibió completamente la actividad Nas, con azida se detectó el 21% de la máxima actividad y el EDTA disminuyó parcialmente la actividad Nas. La NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* también se inhibe en presencia de azida (16 % de la máxima actividad), mientras que la inhibición es parcial en presencia de EDTA (75 % de la máxima actividad) (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). El resto de inhibidores no resultaron efectivos. Compuestos reductores de grupos -SH, como DTT y *p*OH-HgBzOH, no inhibieron la actividad Nas. Este último sí inhibe la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (sólo se detectó un 5% de la máxima actividad) (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992), así como la Nas de *Phormidium laminosum* (Blanco Mediavilla, 1992).

5.2.2.h. Valores de K_m para el MV, NO_3^- y Fd.

Siguiendo las pautas detalladas en Materiales y Métodos (pág. 34), se llevó a cabo la determinación de K_m para el sustrato (NO_3^-), el MV y la Fd. Los valores obtenidos se recogen en la tabla 5.5.

Sustrato	K_m
NO_3^-	$0,95 \pm 0,12$ mM
Fd	$43,7 \pm 14,0$ nM
MV	$0,66 \pm 0,12$ mM

Tabla 5.5. Valores de K_m obtenidos para el nitrato y los donadores de electrones (MV y Fd) empleados en la reducción de nitrato por la Nas.

La K_m para el NO_3^- es considerablemente inferior a la descrita para la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). Sin embargo, se encuentra dentro del rango obtenido para otras NR, cuyo valor oscila entre 0,1 y 1,6 mM (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). La K_m para la Fd es mucho menor que para el MV lo que indica que la afinidad de la Nas por la Fd es mayor que la afinidad de ésta por el MV. La Nas de *Phormidium laminosum* también tiene una K_m más pequeña para la Fd que para el MV (25 μM y 1,4 mM, respectivamente) (Blanco Mediavilla, 1992). Estos datos apoyan la idea de que la Fd tiene un papel fisiológico importante en la reducción asimilativa del nitrógeno como donador de electrones.

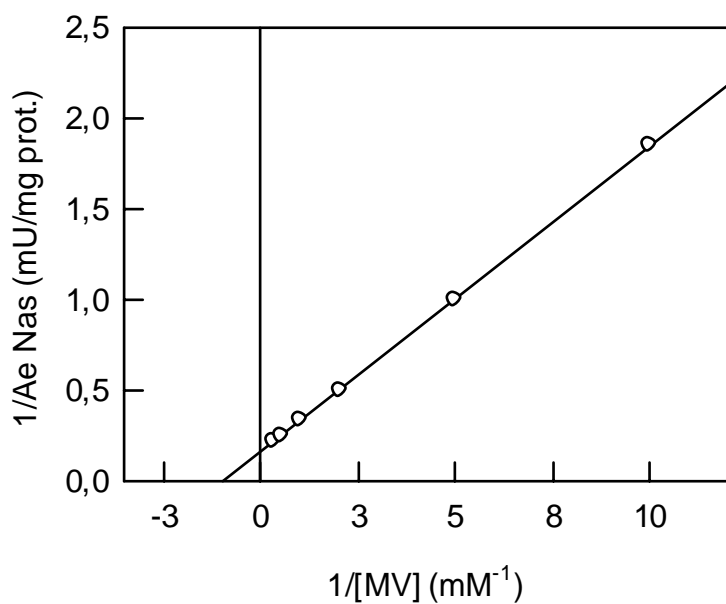


Figura 5.15. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el MV en el ensayo MV-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

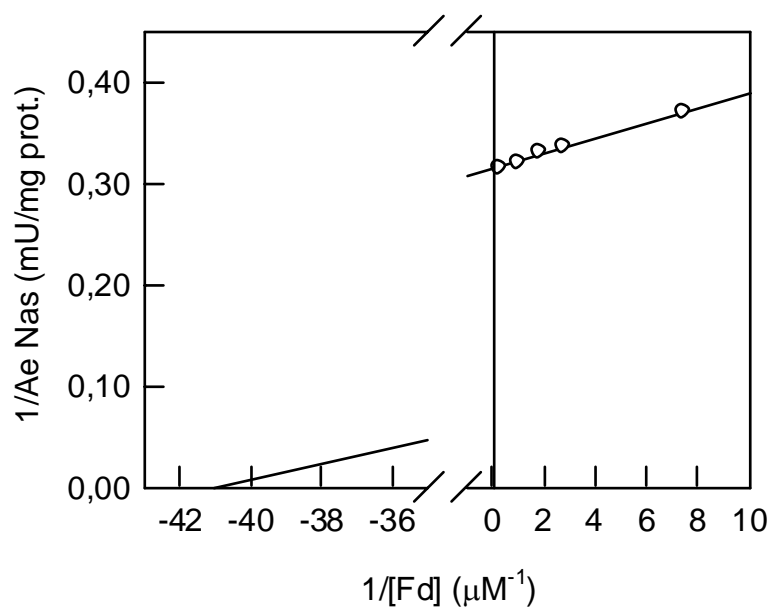


Figura 5.16. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para la ferredoxina en el ensayo Fd-DT-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

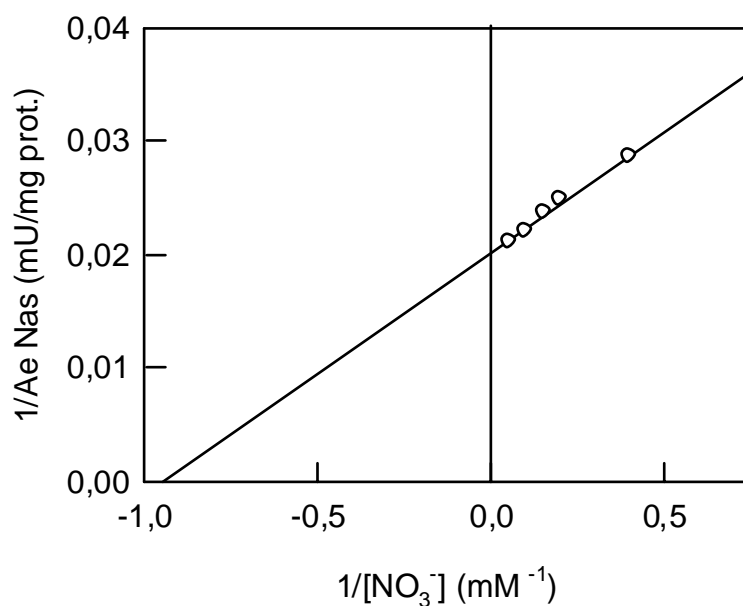


Figura 5.17. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el NO_3^- en el ensayo MV-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

5.2.2.i. Espectro de absorción UV-visible de la Nas de *Haloferax mediterranei*.

El estudio de los espectros de absorción obtenidos a partir de las proteínas purificadas es importante, ya que permite deducir la presencia de grupos hemo, grupos Fe-S, centros de cobre... en la estructura. La enzima purificada mostraba una coloración rojiza con el espectro de absorción que se recoge en la figura 5.18. En él puede observarse un máximo de absorción a 404 nm (439 nm para la proteína reducida con DT).

Este máximo de absorción podría ser debido a la presencia de grupos FAD, centros Fe-S o bien citocromos. La posibilidad de encontrar grupos FAD en la estructura de la Nas se desechó, ya que los grupos FAD estudiados tienen un pico de máxima absorción a 450

nm. Los citocromos, que pueden ser de tipo a, b y c, tienen máximos de absorción a 600, 560 y 550 nm, respectivamente (Lübben, 1995). Estos máximos de absorción no son detectados en el espectro de la figura 5.18.

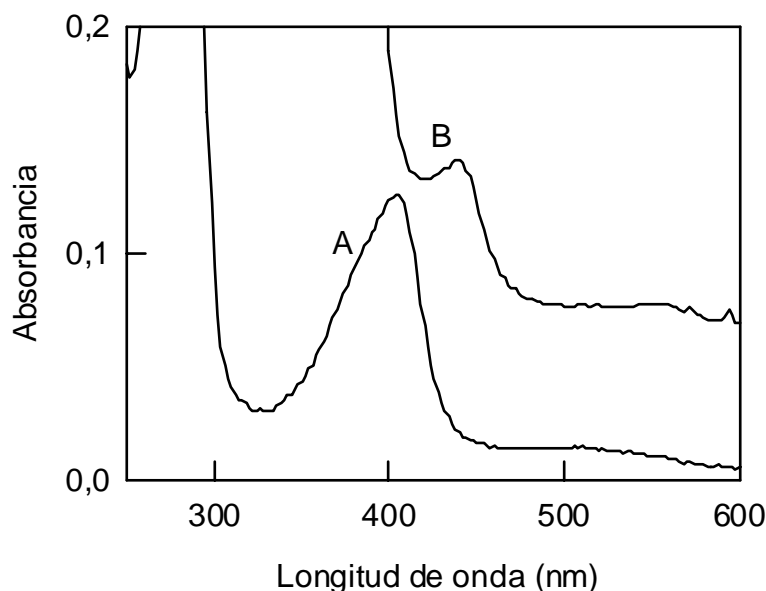


Figura 5.18. (A) espectro de la Nas purificada (30 μg de proteína /ml) en 50 mM fosfato pH 7,0, 2 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la enzima oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducir la muestra y obtener el espectro (B).

Una vez descartada la posibilidad de encontrar citocromos o grupos FAD en la estructura de la Nas, cabría la posibilidad de que el máximo de absorción detectado a 404 nm sea debido a la presencia de grupos Fe-S. Las proteínas ferro-sulfuradas contienen hierro (figura 4.19), pero este hierro no está presente en forma de grupo hemo como en los citocromos, sino que está asociado con átomos de azufre inorgánico o con átomos de azufre de residuos de Cys de la proteína, o con ambos al mismo tiempo (Lehninger *et al.*, 1993).

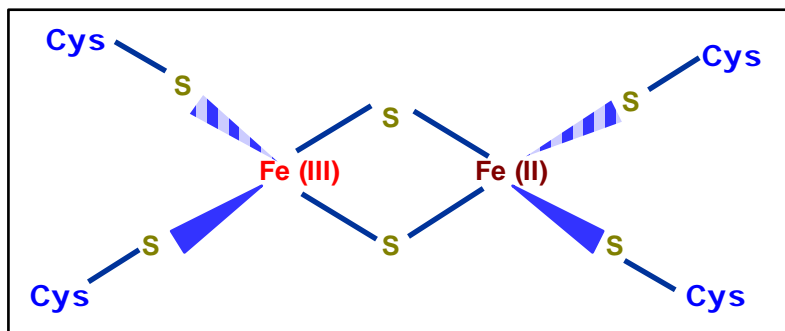


Figura 5.19. Representación esquemática de la estructura característica de los grupo Fe-S (2Fe-2S) (Lehninger *et al.*, 1993).

El espectro de absorción de la NR no asimilativa de *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu *et al.*, 2000) presenta un máximo de absorción centrado en 400 nm. En este caso, los autores también proponen que la presencia de grupos Fe-S (del tipo 4Fe-4S ó 3Fe-3S) da lugar a este máximo de absorción.

5.2.2.j. Cuantificación del molibdeno presente en la Nas de *Haloferax mediterranei*.

Como ya se citó en el apartado 4.10 (pág. 71), el molibdeno (Mo) es un metal que está en el centro activo de las enzimas que lo contienen y se halla unido a una pterina formando un complejo denominado **MoCo**. El Mo por sí mismo es biológicamente inactivo, pero al unirse a la pterina adquiere la capacidad de ser catalizador (figura 5.20). El complejo tiene la misma estructura en todas las enzimas estudiadas, por lo que se dice que es un complejo universal y ubicuo que puede asociarse a diferentes apoenzimas, dando lugar a un conjunto de enzimas que reciben el nombre de **molibdoenzimas**. Dependiendo de la apoenzima, el Mo cataliza reacciones de reducción del C, N o S (Mendel, 1997).

Los análisis estructurales realizados, demuestran que el complejo MoCo está localizado en el interior de las enzimas y que la pterina y los grupos Fe-S encontrados en la estructura de diversas NR participan en la transferencia de electrones hasta o desde el átomo de Mo (Lin y Stewart, 1998).

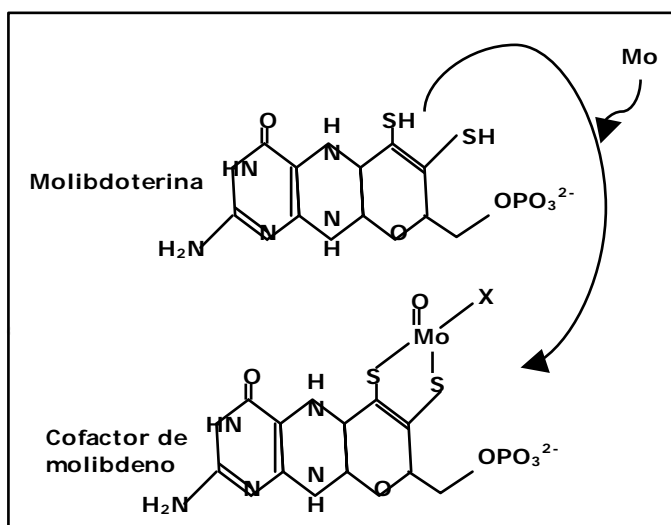


Figura 5.20. Representación esquemática de la estructura característica del cofactor de molibdeno (Mendel, 1997).

El ensayo presentado en el apartado 4.10 (pág. 71) pone en evidencia la importancia del Mo en la actividad Nas de *Haloferax mediterranei*. Hemos cuantificado el Mo presente en dicha enzima, mediante espectrometría de absorción atómica por cámara de grafito (OPTIMA 3000 de Perkin-Elmer). Para la obtención de la recta patrón se utilizó la solución patrón de Mo de la casa Panreac ($1,000 \pm 0,002$ g/l).

Se tomaron 2 ml de Nas purificada ($20 \mu\text{g/ml}$) y se dializaron frente a 100 volúmenes de tampón 20 mM Tris pH 9, 20 (p/v) glicerol. Seguidamente, se realizó la lectura de absorbancia (por triplicado) a

313,3 nm. El paladio fue el modificador empleado durante el ensayo (5 μ l de paladio/20 μ l de muestra).

La cantidad de Mo estimada para la Nas de *Haloferax mediterranei* es $0,4 \pm 0,065$ moles de Mo/mol de enzima. Este valor es inferior a la cantidad de Mo estimada para la NR de membrana de *Pyrobaculum aerophilum* (0,8 moles Mo/mol enzima) (Afshar *et al.*, 2001). Sería necesario utilizar equipos de mayor sensibilidad para mejorar la cuantificación del metal, así como una mayor cantidad de proteína pura.

5.2.3-. CARACTERIZACIÓN DE LA NiR ASIMILATIVA DE HALOFERAX MEDITERRANEI.

Al igual que para la Nas, los estudios de caracterización se realizaron con las fracciones procedentes de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que la proteína estaba muy concentrada y la pureza era considerable.

5.2.3.a. Determinación del producto de reacción de la NiR asimilativa.

Cuando las medidas de actividad NiR se realizan empleando la determinación colorimétrica del NO_2^- consumido (Snell y Snell, 1949), resulta difícil determinar si se trata de una enzima asimilativa o no asimilativa (puesto que se estima el consumo de sustrato y no la naturaleza del producto de la reacción: NH_4^+ u óxidos de nitrógeno). Por ello, resulta necesario determinar cuál es el producto de la reacción (amonio: vía asimilativa; óxidos de nitrógeno: vía no asimilativa).

Para ello se prepararon mezclas de reacción según se indica en Materiales y Métodos (pág. 28). Tras detener la reacción mediante agitación vigorosa (oxidación de DT), la mezcla de reacción se empleó como muestra para ensayos de cuantificación de amonio (apartado 3.2.4, pág. 29). La cuantificación de amonio se realizó por triplicado frente a un control que consistía en mezcla de reacción sin extracto enzimático. En todos los ensayos realizados, se detectó la presencia de amonio como producto de la reacción. Este ensayo resultó determinante para proponer que la NiR estudiada es una enzima asimilativa.

5.2.3.b. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa.

En el ensayo de la actividad MV-NiR asimilativa (figura 5.21), se aprecia que el consumo de NO_2^- (disminución de la Abs. a 540 nm) aumenta de forma lineal con la cantidad de NiR purificada presente en el ensayo.

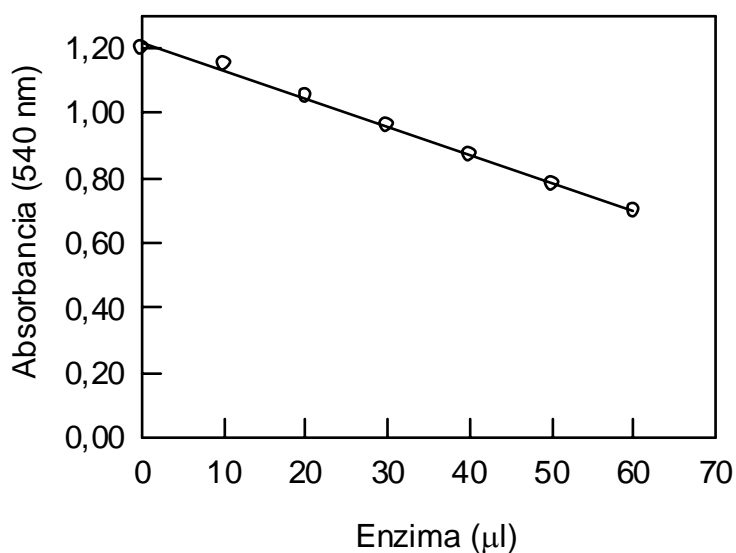


Figura 5.21. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,2 mg/ml, la concentración de proteína.

5.2.3.c. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR asimilativa.

Se llevó a cabo un estudio del efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 5.22.

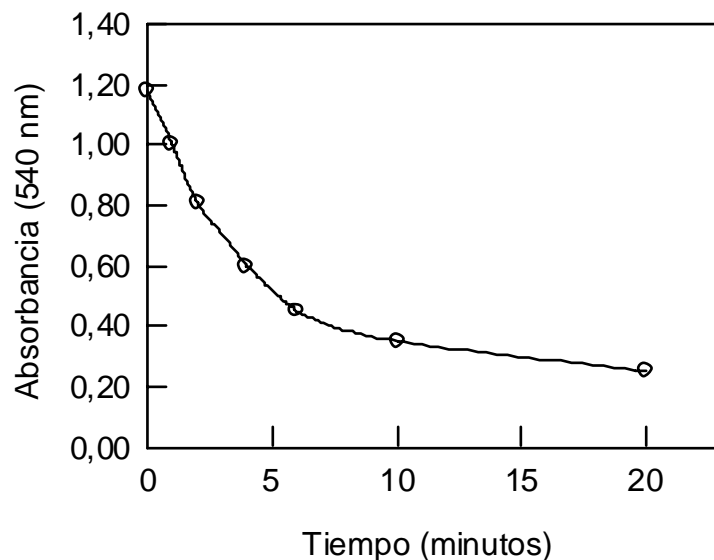


Figura 5.22. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,2 mg/ml, la concentración de proteína.

Como puede apreciarse, el consumo de NO_2^- (sustrato de la reacción) se desarrolla durante los primeros 5 minutos (empleando la concentración de enzima indicada). Tras este tiempo, el consumo de NO_2^- es prácticamente nulo.

5.2.3.d. Efecto del pH sobre la actividad NiR asimilativa.

Con el fin de determinar el pH óptimo para la actividad NiR preparamos tampón de reacción a distintos valores de pH y medimos actividades para cada uno de los valores de pH, a dos temperaturas diferentes: 60 °C y 40 °C.

El factor de corrección de pH para la disolución amortiguadora (tampón fosfato) empleada en este estudio es 0,0028. Debido a la pequeña magnitud de este factor, la variación de pH en los ensayos realizados es también pequeña.

Se ha detectado descomposición espontánea del NO_2^- en función del valor de pH y de la temperatura escogidos para los ensayos. Esta descomposición, aumentaba a medida que la temperatura se incrementaba y cuando el valor pH de la disolución era más ácido. Para eliminar el error que había a causa de la descomposición espontánea, se determinó ésta para cada valor de pH y temperatura, corrigiendo así el valor de la actividad enzimática. Una vez cuantificada la descomposición espontánea, escogimos la temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ y un valor de pH de 7,5 para la medida de actividad NiR, ya que son las condiciones en las que la actividad NiR es mayor. La dependencia de la actividad específica NiR respecto a diferentes valores de pH, se muestra en la siguiente figura:

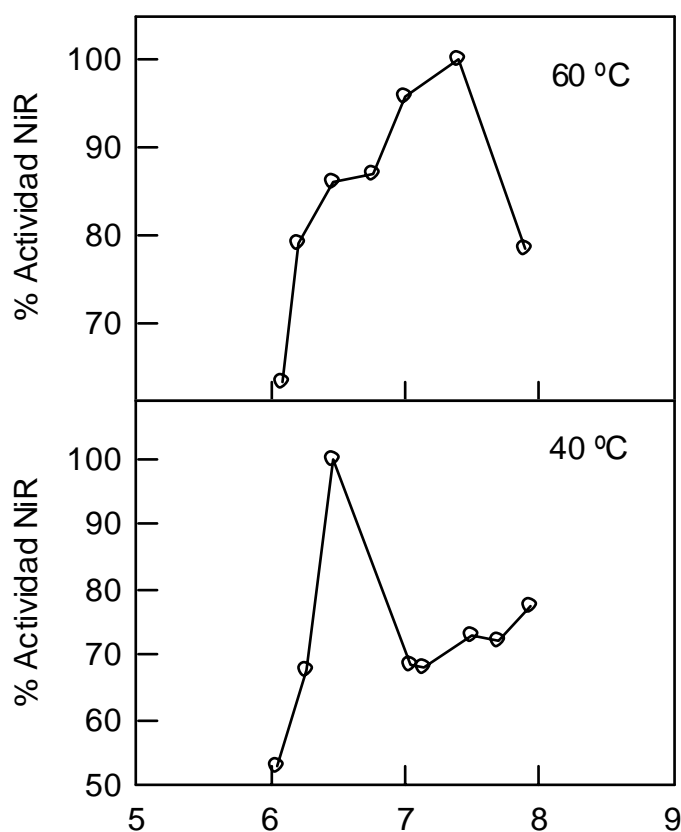


Figura 5.23. Dependencia de la actividad NiR asimilativa respecto del valor de pH a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y $40\text{ }^\circ\text{C}$.

Como puede observarse en la figura 5.23, el pH óptimo para la actividad NiR asimilativa es 7,5 cuando la actividad es medida a 60 °C. Si la temperatura es 40 °C, el pH óptimo para la actividad es 6,5. El valor de pH óptimo para la NiR a 60 °C (7,5) es el mismo que el obtenido para la actividad NiR de *Candida utilis* (Sengupta *et al.*, 1996). También la NiR asimilativa de la cianobacteria *Phormidium laminosum* tiene un pH óptimo entre 7,3 y 7,6, aunque esta enzima se inactiva totalmente a partir de los 60 °C (Arizmendi, 1989).

Existe una NiR no asimilativa extraída de *Haloferax denitrificans* que contiene cobre. El valor de pH óptimo para esta actividad está entre 4,8 y 5,0 (Inatomi y Hochstein, 1996). Analizando toda la bibliografía consultada, destaca el hecho de que las NiR asimilativas de procariotas suelen tener valores de pH cercanos a 7, mientras que las no asimilativas trabajan a valores menores de pH, como es el caso de esta NiR no asimilativa de *Haloferax denitrificans*.

En principio, las diferencias entre la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* y la NiR de *Haloferax denitrificans*, respecto a los valores de pH óptimo, concuerdan con el hecho de que a pesar de ser enzimas de la misma familia, en el fondo son muy diferentes. Las NiR de cobre son enzimas que participan en la reducción no asimilativa del NO_2^- (desnitrificación) y pueden tener uno o dos átomos de Cu en su centro activo (Suzuki *et al.*, 1997; Inatomi y Hochstein, 1996), mientras que la NiR de *Haloferax mediterranei* pertenece a la vía asimilativa del NO_2^- y como se discute en el apartado 5.2.3.j (pág. 127) no tiene Cu en su estructura.

5.2.3.e. Efecto de la temperatura y la [NaCl] sobre la actividad NiR asimilativa.

Al igual que para la Nas, se ha estudiado cómo varía la actividad NiR de *Haloferax mediterranei* en función de la temperatura, cuando se modifica la concentración de NaCl presente en el ensayo. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 5.24.

A medida que aumenta la temperatura, se observa una primera fase en la que la actividad aumenta debido al incremento de la energía cinética de las moléculas que participan en la reacción. Si la temperatura sigue incrementando, la enzima comienza a desnaturalizarse y por ello disminuye la actividad.

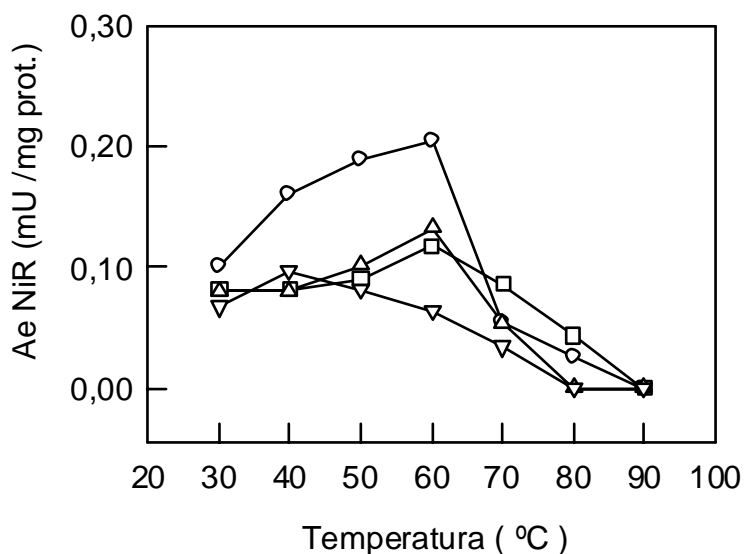


Figura 5.24. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad NiR. (O) 3,3 M NaCl, (□) 2,7 M NaCl, (Δ) 2,0 M NaCl y (▽) 0,9 M NaCl.

La máxima actividad se obtiene cuando la temperatura es 60 °C y la concentración de NaCl es 3,3 M. Si la concentración de NaCl es baja (0,9 M), la máxima actividad se desarrolla a una temperatura de 38 °C. Con este ensayo podemos apreciar el efecto protector de la sal frente a la desnaturalización por calor. Este comportamiento es característico de la mayor parte de enzima halofílicas estudiadas hasta el momento (Camacho *et al.*, 1995; Dym *et al.*, 1995).

5.2.3.f. Energías de activación para la actividad NiR asimilativa.

En la tabla 5.6 se recogen los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*. Como ocurre para la Nas, aquellos ensayos en los que la [NaCl] presente era más baja, implican una mayor energía de activación.

Pendiente	r ²	Rango de temperatura	[NaCl]	E _a (kJ/mol)
-1,01	0,91	30-60 °C	3,3 M	10,4
-0,80	0,90	30-60 °C	2,0 M	21,4

Tabla 5.6. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*.

Los valores de E_a obtenidos, son menores que los encontrados para la NiR asimilativa de *Phormidium laminosum* (Arizmendi, 1989), cuya E_a se encuentra en torno a 50 kJ/mol (en ensayos a 50 °C). No se ha descrito la E_a para la NiR asimilativa de *Candida utilis* (Sengupta *et al.*, 1996) ni tampoco se han caracterizados otras NiR asimilativas halófilas (la NiR presentada en esta memoria es la primera NiR

asimilativa halófila caracterizada), de manera que resulta difícil contrastar los valores de E_a observados.

5.2.3.g. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.

La NiR fue incubada (tampón fosfato a pH 7,0) a 4 °C en presencia de diferentes [NaCl]. A lo largo del período de incubación se extrajeron alícuotas para realizar la medida de actividad. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente gráfica:

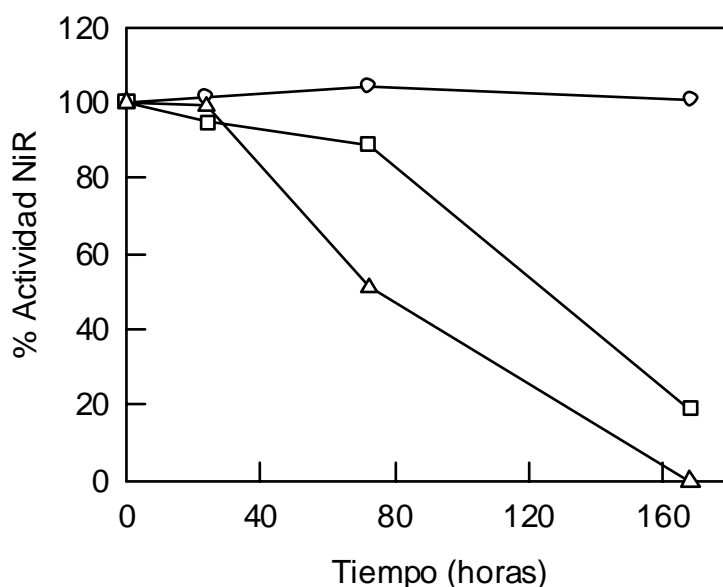


Figura 5.25. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad específica NiR asimilativa. (O) 3,6 M NaCl, (□) 2,6 M NaCl y (Δ) 1,8 M NaCl.

Como se desprende de la figura 5.25, la estabilidad de la NiR depende de la concentración de sal. Tras 160 horas de incubación, la enzima permaneció prácticamente estable en presencia de 3,6 M de NaCl; con 2,6 M se detectó un 20 % de la actividad inicial; y en

presencia de 1,8 M de NaCl, la actividad se perdió por completo. La IDH y la GDH de *Haloferax mediterranei* manifiestan el mismo comportamiento (Camacho *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1996). Cuando dializábamos la NiR frente a tampón 50 mM fosfato pH 7,0 y 20 % glicerol, la enzima podía ser almacenada más de dos semanas sin que hubiese una pérdida de actividad significativa.

La NiR de *Haloferax denitrificans* (Inatomi y Hochstein, 1996) resultó ser una enzima muy estable durante un período de dos semanas en ausencia de NaCl. Esta diferencia nos hace pensar que las enzimas de la vía asimilativa son más inestables y vulnerables que las enzimas no asimilativas. Esta hipótesis no puede ser contrastada por el momento, ya que no existe ninguna NiR asimilativa de arqueas purificada y caracterizada, a excepción de la que se presenta en esta memoria.

5.2.3.h. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad NiR asimilativa.

Los resultados recogidos en la tabla 5.7 muestran que el MV reducido es el mejor donador de electrones (*in vitro*). La NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* no es capaz de emplear NADH como donador de electrones, sin embargo, con NADPH se obtenía el 10 % de la máxima actividad. La NiR asimilativa de *Candida utilis* sí emplea el NADPH como donador de electrones (se detectó la máxima actividad, al igual que con MV) (Sengupta *et al.*, 1996), sin embargo la enzima de *Phormidium laminosum* no es capaz de emplear nucleótidos de piridina (Arizmendi, 1989).

El DT no fue capaz de reducir el NO_2^- en ausencia de MV. En presencia de FAD, se obtuvo el 50 % de la máxima actividad. La ferredoxina reducida por DT fue tan eficiente como el MV en la

reducción de NO_2^- , por lo que proponemos que es el donador de electrones fisiológico. Las NiR no asimilativas no pueden emplear Fd como donador de electrones (Zumft, 1997). En presencia de donadores de electrones reducidos, como DPIP o PMS, se obtuvo una actividad inferior al 35 % de la máxima actividad NiR (obtenida en las condiciones estándar).

<i>Sistema</i>	<i>Actividad (%)</i>
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV}$	100,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{sulfito}$	75,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{pOH-HgBzOH}$	75,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{Azida}$	54,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{EDTA}$	47,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{Cianuro}$	9,5
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{DPIP}$	10,5
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{PMS}$	34,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{DTT}$	93,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{MV} + \text{KClO}_3$	73,0
$\text{MV} + \text{NADH}$	2,7
$\text{MV} + \text{NADPH}$	17,0
NADH	0,0
NADPH	10,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	0,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{PMS}$	17,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{DPIP}$	24,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{FAD}$	55,0
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-} + \text{Fd}$	100

Tabla 5.7. Reducción de NO_2^- en presencia de diferentes cofactores, donadores de electrones e inhibidores. La concentración de los diferentes compuestos fue: 17 mM DT, 4 mM MV, 200 nM Fd y 1 mM para el resto de compuestos. El 100% de actividad específica NiR es $0,9 \times 10^2 \text{U/mg proteína}$.

En cuanto a los inhibidores, el KClO_3 y el DTT no inhibieron la NiR. Al igual que ocurre con la Nas caracterizada, la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* se inhibió en presencia de cianuro y azida, aunque la inhibición por cianuro es mucho más acusada. En este sentido cabe destacar que la NiR de *Phormidium laminosum* también resultó ser una enzima fuertemente inhibida por cianuro y parcialmente inhibida por azida (Arizmendi, 1989). Compuestos que reaccionan con grupos sulfidrilo como $p\text{OH-HgBzOH}$ y el sulfito, inhibieron la actividad NiR del presente estudio. La inhibición por $p\text{OH-HgBzOH}$ implica la presencia de grupos sulfidrilo libres que participan en la reducción de NO_2^- . Van't Riet y Planta (1975) observaron que el $p\text{OH-HgBzOH}$ afecta la conformación de la NiR en las proximidades del centro activo mediante su unión a cisteínas y a los átomos de S de los centros Fe-S.

5.2.3.i. Valores de K_m para el MV, NO_2^- y Fd.

Siguiendo las pautas detalladas en Materiales y Métodos (pág. 34), se llevó a cabo la determinación de K_m para el sustrato (NO_2^-), el MV y la Fd. Los valores obtenidos se recogen en la tabla 5.8.

Sustrato	K_m
NO_2^-	$8,6 \pm 0.2 \text{ mM}$
Fd	$32 \pm 11 \text{ nM}$
MV	$1,9 \pm 0.2 \text{ mM}$

Tabla 5.8. Valores de K_m obtenidos para el nitrito y los donadores de electrones (MV y Fd) empleados en la reducción de nitrito por la NiR asimilativa.

La K_m para el NO_2^- es muy alta en comparación con las de NiR asimilativas de otros organismos no halófilos, tales como cianobacterias fotosintéticas (0,1-0,8 mM) (Arizmendi *et al.*, 1981) o calabacín (1 μM) (Vega *et al.*, 1980). No obstante, también se han descrito valores altos (2 mM) de K_m para el nitrito en el caso de la NiR asimilativa de hojas y raíces de cebada (Bourne y Miflin, 1973). El valor de K_m obtenido para el MV también es superior al descrito para NiR asimilativas de cianobacterias (Arizmendi, 1989), así como para la NiR asimilativa de *Candida utilis* (Sengupta *et al.*, 1996). No obstante, Romero (1988) obtuvo un valor de 0,91 mM para la enzima de *Chlamydomonas reinhardtii*. La K_m para la Fd es mucho menor que para el MV lo que indica que la afinidad de la NiR por la Fd es mayor que la afinidad de ésta por el MV. Este dato apoya la idea de que la Fd tiene un papel fisiológico importante en la reducción asimilativa del nitrógeno, como donador de electrones.

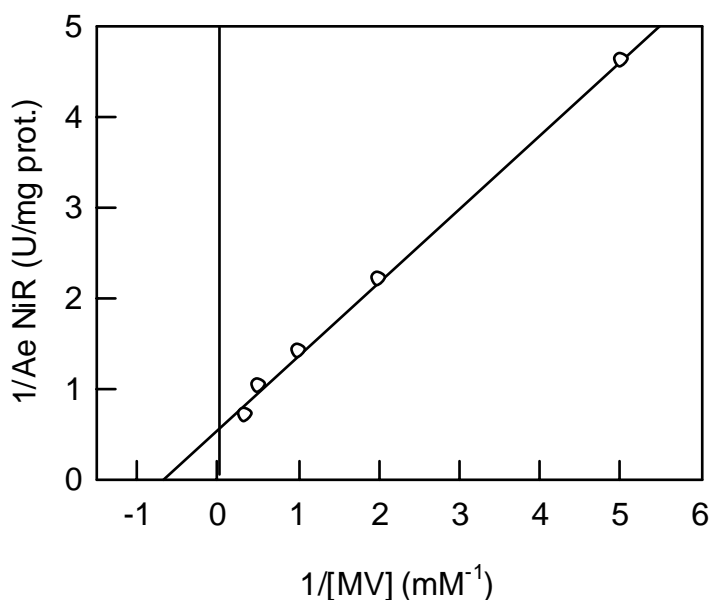


Figura 5.26. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR asimilativa para el MV en el ensayo MV-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

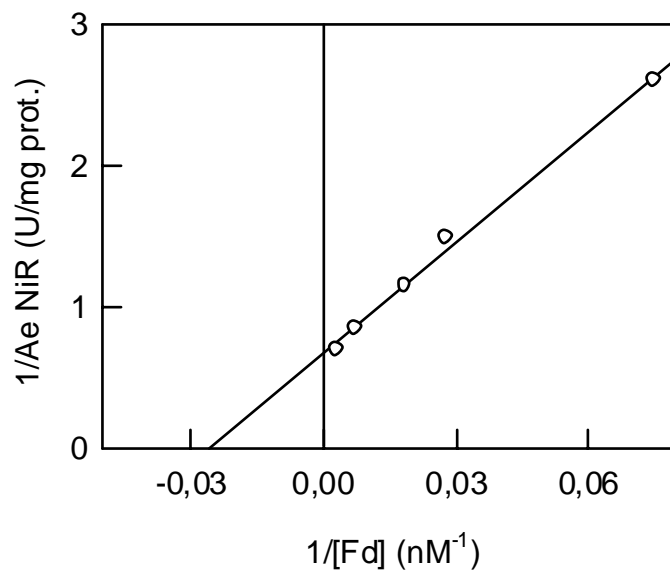


Figura 5.27. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR asimilativa para la ferredoxina en el ensayo Fd-DT-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

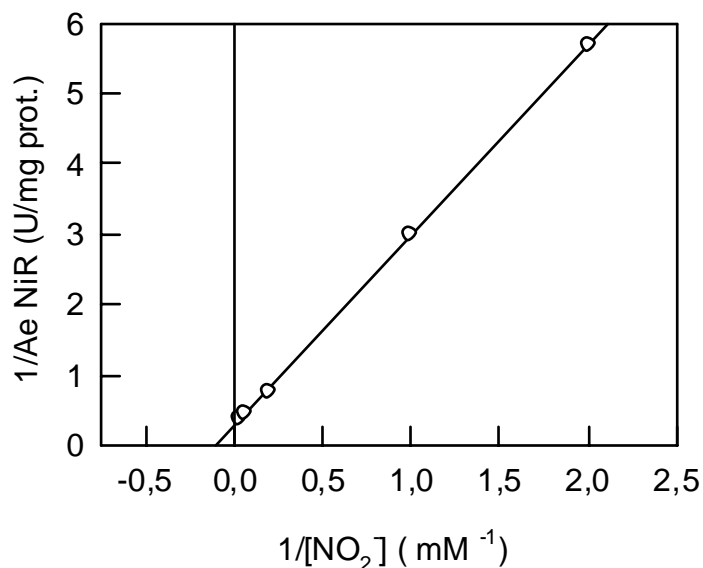


Figura 5.28. Representación doble-recíproca para el cálculo de K_m de la NiR asimilativa para el NO_2^- en el ensayo MV-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

5.2.3.j. Espectro de absorción de la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*.

Como ya se citó en el apartado 5.2.2.i (pág. 109), el estudio de los espectros de absorción obtenidos a partir de las proteínas puras permiten deducir la presencia de grupos hemo, grupos Fe-S o centros de cobre en la estructura. En el espectro de la NiR asimilativa se observa, además del máximo de absorbancia a 288 nm debido a la presencia de proteína, valores elevados de absorbancia a 310, 410, 500 y 545 nm. Este espectro no es el característico de proteínas que tienen citocromos o FAD, tanto en estado oxidado como reducido. La adición de unos cristales de DT para reducir la enzima provocó un desplazamiento del espectro de absorción, de manera que el máximo de absorbancia centrado en 410 nm en la forma oxidada se desplazó hasta 428 nm en la forma reducida.

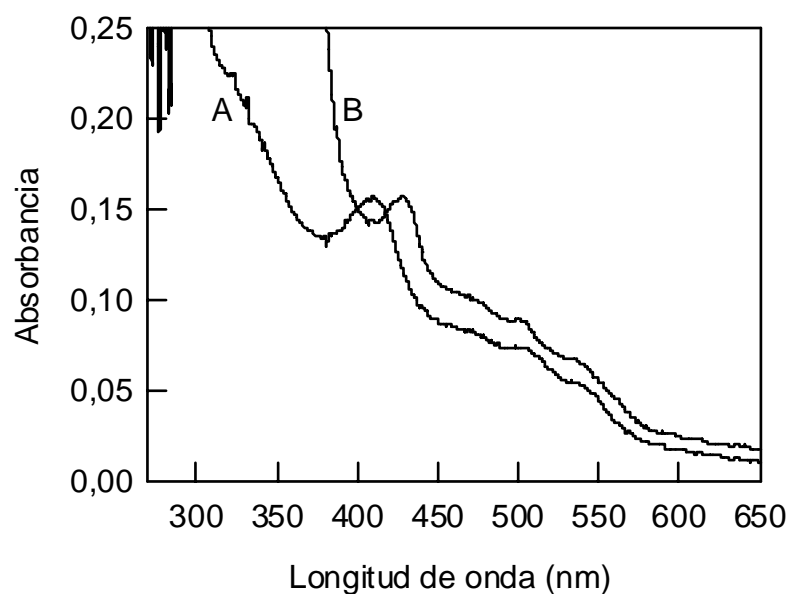


Figura 5.29. (A) espectro de la NiR purificada (30 μg de proteína /ml) en 50 mM fosfato pH 7,0, 20 % glicerol y 0,5 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la enzima oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducir la muestra y obtener el espectro (B).

Mediante comparación con otros espectros de NiR asimilativas citoplasmáticas, deducimos que la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* es una proteína que contiene sirohemo y centro Fe-S (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Los grupos sirohemo son característicos de enzimas multielectrónicas como la NiR (Murphy *et al.*, 1973). El desplazamiento que se observa a 410 nm (428 nm en la forma reducida) puede ser debido a la reducción que sufre el grupo sirohemo en presencia de DT (Arizmendi, 1989).

**CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS Nas , NiR ASIMILATIVAS
DE *Haloferax mediterranei*.**

↗ Las dos enzimas purificadas y caracterizadas en esta memoria, nitrato y nitrito reductasas asimilativas, forman parte de la vía asimilativa del nitrato/nitrito en *Haloferax mediterranei*, de manera que esta arquea halófila es capaz de crecer en medios mínimos con nitrato y/o nitrito como única fuente de nitrógeno.

↗ La Nas estudiada es una molibdoenzima heterodimérica con una pH óptimo en torno a 9. Es una enzima termoactiva cuya estabilidad y actividad dependen de la concentración de NaCl presente en el medio. La enzima no es NAD(P)H dependiente y contiene Mo en su estructura.

↗ La NiR asimilativa es un monómero cuyo pH óptimo es 7,5 a temperaturas próximas a los 60 °C (3,3 M NaCl). La actividad y la estabilidad de la enzima dependen de la concentración de NaCl presente en el medio. La enzima no es NAD(P)H dependiente y contiene sirohemo y centro Fe-S en su estructura.