



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 dels 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
DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA, BIOQUÍMICA Y Q. ANALÍTICA

CARACTERIZACIÓN DE DOS GLUTAMATO DESHIDROGENASAS DE
Halobacterium halobium: NAD-GDH y NADP-GDH. MECANISMO
CINÉTICO DE NAD-GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

Memoria que presenta
D^a MONICA L. CAMACHO CARRASCO
para aspirar al Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
SECCION QUÍMICAS

1 9 8 9





Universidad de Alicante

DEPARTAMENTO DE AGROQUIMICA, BIOQUIMICA
Y QUIMICA ANALITICA

APTDO. 99 - 03080 ALICANTE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

EDUARDO CADENAS BERGUA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Departamento de Agroquímica, Bioquímica y Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante,

CERTIFICA: Que el trabajo contenido en esta Memoria bajo el título:

CARACTERIZACION DE DOS GLUTAMATO DESHIDROGENASAS DE *Halobacterium halobium*: NAD-GDH y NADP-GDH. MECANISMO CINÉTICO DE NAD-GLUTAMATO DESHIDROGENASA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas, presenta D^a Mónica L. Camacho Carrasco ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección de la Doctora M^a José Bonete Pérez.

Y para que conste a los efectos de la presentación en la Comisión de Doctorado, expido el presente certificado en

Alicante, Mayo de 1989

Eduardo Cadenas Bergua
Director del Departamento de
Agroquímica, Bioquímica y Q. Analítica de
la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Alicante.

FACULTAD DE CIENCIAS-BIBLIOTECA	
UNIVERSIDAD DE ALICANTE	
N.º REGISTRO	5513
FECHA	26-7-1989
CDU	
SIGNATURA	TESIS



Universidad de Alicante

DEPARTAMENTO DE AGROQUIMICA, BIOQUIMICA
Y QUIMICA ANALITICA

APTDO. 99 - 03080 ALICANTE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

María José Bonete Pérez, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alicante, como directora de la Tesis titulada "**Caracterización de dos glutamato deshidrogenasas de *Halobacterium halobium*: NAD-GDH y NADP-GDH. Mecanismo cinético de NAD-glutamato deshidrogenasa**", que presenta Dña. Mónica L. Camacho Carrasco para optar al Grado de Doctora en Ciencias, Sección Químicas

INFORMA

que reúne las condiciones necesarias para ser juzgada por el tribunal correspondiente y autoriza su presentación.

Lo que firmo en Alicante a 18 de Mayo de 1989

Fdo: Dra. María José Bonete Pérez

Profesora Titular de Bioquímica
y Biología Molecular



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Trabajo presentado para optar al Grado de
Doctor en Ciencias, Sección Químicas

Alicante, Mayo de 1989

Mónica Camacho

Mónica L. Camacho Carrasco
Licenciada en Ciencias Químicas



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

La firmante de esta Memoria ha disfrutado de una Beca del Proyecto de Investigación 8/85 firmado dentro del Convenio Marco existente entre la Excma. Diputación Provincial y la Universidad de Alicante, durante los años 1984-1986 y 1988-1989.




Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Parte de los resultados que se expresan en esta Memoria han dado lugar a comunicaciones presentadas en los siguientes Congresos:

- * XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica. Valencia, 15-18 de Septiembre 1985.
- * XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica. Zaragoza, 15-18 de Septiembre de 1986.
(2 comunicaciones).
- * XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica. Málaga, 27-30 de Septiembre de 1987.
(2 comunicaciones).
- * III Congreso Luso-Español de Bioquímica. Santiago de Compostela, 12-16 de Septiembre de 1988.

y a los siguientes artículos en Revistas Internacionales:

- * "Purification and Some Properties of NAD-Dependent Glutamate Dehydrogenase from *Halobacterium halobium*" (1986). M.J.Bonete, M.L.Camacho y E.Cadenas. *Int.J.Biochem.* 18, 785-789.
- * "A New Glutamate Dehydrogenase from *Halobacterium halobium* with Different Coenzyme Specificity". (1987). M.J.Bonete, M.L.Camacho y E.Cadenas. *Int.J.Biochem.* 19, 1149-1155.
- * "Kinetic Mechanism of *Halobacterium halobium* NAD-Glutamate Dehydrogenase". (1989). M.J.Bonete, M.L.Camacho y E.Cadenas. *Biochim.Biophys.Acta* 990, 150-155.



Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. D^a María José Bonete Pérez por su dirección, consejos y ayuda constante a lo largo de la realización del presente Trabajo, sin los cuales no se podría haber llevado a cabo.

Igualmente quiero agradecer al Dr. D. Eduardo Cadenas Bergua su apoyo y críticas científicas, así como a todos los miembros del Departamento de Bioquímica (especialmente al Dr. Llorca y a la Dra. Cadenas) por su colaboración, y a todas las personas que me han ido alentando día a día en la realización de esta Tesis.

Asimismo doy las gracias al Centro de Cálculo de la Universidad de Alicante, y en especial a D. Juan Manuel Aparicio García, por la ayuda prestada en la elaboración de los cálculos, y al Dr. D. Francisco Rodríguez Valera, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de esta Universidad, por la cesión del material biológico utilizado.

Alicante, Mayo de 1989



INDICE.

	<u>Página</u>
1. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO.....	0
2. PARTE TEORICA.....	3
2.1. Arqueobacterias: Halobacterias.....	4
2.1.1. Arqueobacterias. Filogenia.....	4
2.1.2. Halobacterias. Condiciones de crecimiento.	6
2.1.3. Localización de los halófilos extremos....	8
2.1.4. Metabolismo de las halobacterias y comparaciones con los otros linajes.....	11
2.1.5. Proteínas halofílicas.....	14
2.1.5.1. Requisitos salinos. Estabilidad..	15
2.1.5.2. Requisitos salinos. Actividad....	20
2.2. Deshidrogenasas piridín dependientes.....	23
2.2.1. Generalidades.....	23
2.2.2. Deshidrogenasas halofílicas.....	27
2.3. Glutamato deshidrogenasas.....	30
2.3.1. Función.....	30
2.3.2. Distribución y especificidad de coenzima..	31
2.3.3. Centro de la coenzima.....	37
2.3.4. Centro para sustratos. Inhibidores compe- titivos.....	39
2.3.5. Propiedades moleculares.....	41
2.3.5.1. Agregación.....	41
2.3.5.2. Estructura del oligómero. Peso molecular.....	43
2.3.5.3. Estabilidad, desnaturalización y disociación en subunidades.....	44
2.3.5.4. Composición de aminoácidos y centro activo.....	47
2.3.6. Mecanismo químico de reacción.....	51
2.4. Mecanismos cinéticos.....	55
2.4.1. Estudios de velocidad inicial.....	56

2.4.2.	Estudios de inhibición por producto.....	60
2.4.3.	Estudios de inhibición mixta por producto y dead-end.....	62
2.4.4.	Estudios de inhibición por análogos de sustratos. Inhibición competitiva.....	65
2.4.5.	Ejemplos de enzimas con distintos tipos de mecanismos.....	68
2.5.	Mecanismo cinético de glutamato deshidrogenasa...	71
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	78
3.1.	Materiales.....	79
3.1.1.	Reactivos.....	79
3.1.2.	Material biológico.....	80
3.2.	Métodos.....	81
3.2.1.	Medio de cultivo.....	81
3.2.2.	Mantenimiento de la cepa.....	81
3.2.3.	Obtención del inóculo.....	82
3.2.4.	Siembra del inóculo.....	82
3.2.5.	Extracto bacteriano.....	82
3.2.6.	Homogeneización con ultrasonidos.....	83
3.2.7.	Obtención del extracto crudo.....	83
3.2.8.	Determinación cuantitativa de proteína....	84
3.2.9.	Determinación de actividades enzimáticas..	85
3.2.9.1.	Glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente.....	85
3.2.9.2.	Glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente.....	86
3.2.10.	Purificación de glutamato deshidrogenasas.....	86
3.2.10.1.	Cromatografía en Sepharosa-4B...	86
3.2.10.2.	Cromatografía en DEAE-celulosa..	87
3.2.10.3.	Cromatografía de tamizado mole- cular en Sepharosa-4B.....	88
3.2.10.4.	Cromatografía en Sephadex G-100.	88

3.2.10.5. Cromatografía en hidroxapatito.	89
3.2.11. Criterio de pureza.....	89
3.2.12. Determinación del peso molecular aparente.	92
3.2.13. Medida de fluorescencia de GDHs.....	93
3.2.14. Estudio del mecanismo cinético.....	98
3.2.14.1. Método de velocidades iniciales.	98
3.2.14.2. Estudio de inhibición por producto.....	99
3.2.14.3. Estudio de inhibición por análogos de sustratos.....	99
3.2.15. Tratamiento estadístico de los datos cinéticos.....	100
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	102
4.1. Purificación de dos actividades glutamato deshidrogenasas.....	103
4.1.1. Purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente.....	106
4.1.2. Purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente.....	107
4.2. Caracterización de las dos glutamato deshidroge- nasas: NAD-específica y NADP-específica.....	115
4.2.1. pH óptimo y razones de actividad.....	115
4.2.2. Temperatura óptima de actuación.....	120
4.2.3. Efecto de la concentración salina.....	123
4.2.4. Especificidad de coenzima y sustrato.....	125
4.2.5. Peso molecular aparente.....	131
4.2.6. Acción de efectores.....	136
4.2.7. Estabilidad de NAD-GDH y NADP-GDH frente a diversos parámetros.....	145
4.2.7.1. Estabilidad frente al pH.....	145
4.2.7.2. Estabilidad frente a la temperatura.....	147

4.2.7.3. Estabilidad frente a la concentración salina.....	149
4.2.7.4. Estabilidad frente al tiempo de almacenamiento.....	157
4.2.8. Efecto de la disminución de la concentra- ción salina en el espectro de fluorescencia.....	159
4.3. Estudio del mecanismo cinético.....	171
4.3.1. Estudio de velocidades iniciales.....	171
4.3.2. Estudios de inhibición por producto.....	175
4.3.3. Estudios de inhibición por análogos de sustrato.....	185
4.4. Efecto del pH, temperatura y concentración sali- na en los parámetros cinéticos.....	196
4.4.1. Efecto del pH en los parámetros cinéticos.....	196
4.4.2. Efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos.....	209
4.4.3. Efecto de las sales en los parámetros cinéticos.....	215
5. CONCLUSIONES.....	228
6. BIBLIOGRAFIA.....	231
7. APENDICES.....	273
I. Lista de abreviaturas.....	274
II. Lista de tablas.....	275
III. Lista de figuras.....	278



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO.

2. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO.

Las arqueobacterias son microorganismos muy interesantes desde el punto de vista de los comienzos de la evolución de la vida, de hecho, se les dió este nombre para resaltar la hipótesis de que estos organismos fueron los habitantes dominantes de la Tierra en los tiempos remotos. En cuanto a esto, las arqueobacterias, como un reino primario distinto, son muy importantes ya que nos dan indicios de los acontecimientos iniciales en la evolución de las células, contribuyendo así a un mejor entendimiento del ancestro universal.

Están caracterizadas por una amplia diversidad metabólica y un alto grado de variabilidad morfológica que es más o menos comparable a la encontrada en eubacterias. Este grupo comprende aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, termófilos, acidófilos, fotótrofos, cocos, bacilos, y formas pleomórficas y de disco. Las arqueobacterias se clasifican en tres fenotipos principales: halófilos, metanógenos y termófilos. Ellos sobreviven en entornos que normalmente matarían a otros muchos organismos conocidos, de hecho están separados en unos pocos nichos ecológicos peculiares.

La enzimología comparativa y la identificación de diversidad de enzimas de especies dependientes han contribuido significativamente a nuestro entendimiento de la evolución celular y de la relación entre la estructura de la proteína y su función. En la mayoría de los casos, tales estudios se han concentrado en enzimas procedentes de organismos eubacterianos y eucariotas. Sin embargo, con el reconocimiento de las arqueobacterias como un grupo de organismos distinto filogenéticamente, es esencial extender el campo de la enzimología comparativa a este nuevo reino.

Para poder hacer comparaciones de la estructura de enzimas y su función que incluyan ejemplos de especies arqueobacterianas, es necesario determinar qué enzimas del metabolismo central están presentes en estos organismos.

Dado que existen estudios muy recientes sobre las vías centrales del metabolismo de arqueobacterias, pero muy poco sobre el metabolismo nitrogenado de dichos organismos, el objeto de nuestro Trabajo se ha centrado en el estudio de una enzima clave en la asimilación de amonio: **glutamato deshidrogenasa**. Dicha enzima se ha estudiado en un organismo halófilo extremo que metaboliza aminoácidos y proteínas mejor que carbohidratos.

La investigación en este área contribuirá a un mayor entendimiento de estos organismos y su evolución.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. PARTE TEORICA.

2. PARTE TEORICA.

2.1. **ARQUEOBACTERIAS: HALOBACTERIAS.**

2.1.1.- Arqueobacterias. Filogenia.

Un análisis filogenético realizado por catalogación de oligonucleótidos condujo a la propuesta de que hay, al menos, tres reinos primarios entre los organismos vivientes: las eubacterias (las bacterias verdaderas), los eucariotas y las arqueobacterias (Woese y Fox, 1977; Fox y col., 1980; Woese y Gupta, 1981). Sin embargo, la relación filogenética de estos reinos no está del todo clara (Fig. 1). En ciertos aspectos, las arqueobacterias parecen eucariotas pero en otros parecen eubacterias (Woese y Gupta, 1981; Fewson, 1986; Wais, 1986).

Las arqueobacterias agrupan tres clases diferentes de bacterias: metanógenas, halófilas y termoacidófilas (sulfo-dependientes) (Woese y Fox, 1977; Fewson, 1986; Woese y Olsen, 1986; Leffers y col., 1987). Presentan un amplio rango de propiedades bioquímicas y fisiológicas, entre las que cabe destacar su capacidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales que el hombre considera extremas, como pueden ser una temperatura elevada, pH bajo, alta salinidad y anaerobiosis estricta (Tindall y Trüper, 1986). Los metanógenos son organismos anaerobios obligados que reducen CO₂ a metano. Los halófilos necesitan concentraciones elevadas de NaCl, algunos crecen en soluciones salinas saturadas (5.2M) y otros tienen además un pH óptimo elevado (pH 9-10) (Kushner, 1985). Las arqueobacterias termoacidófilas o sulfo-dependientes (Woese y col., 1984; Stetter y Zillig, 1985) se encuentran en ambientes

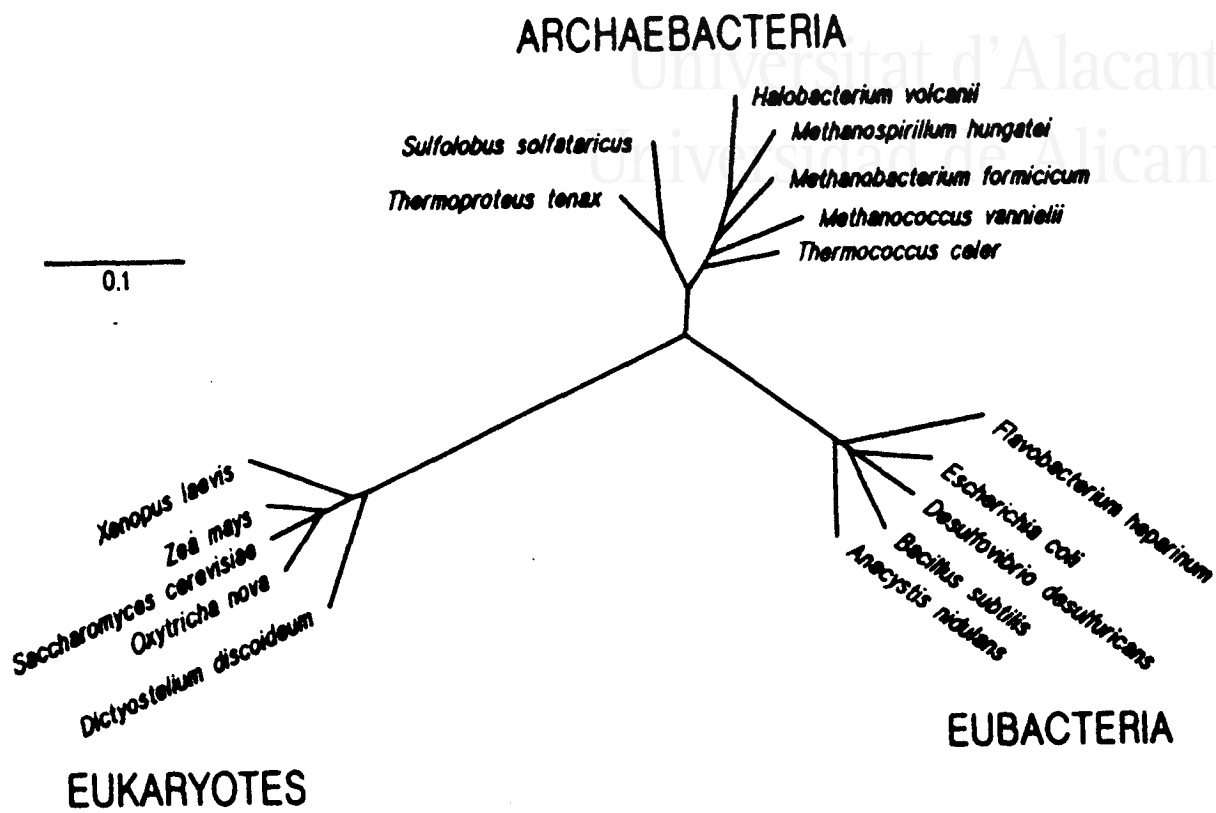


Figura 1 : Arbol filogenético de los tres reinos en los que se agrupan los organismos, construido a partir de las secuencias 16S (ó 18S) de los rRNA (Figura de Woese y Olsen, 1986).

termofílicos (55-100°C), y pueden reducir u oxidar azufre para producir energía.

Fox y col. (1977, 1980), Lake y col. (1984, 1985), Zillig y col. (1985) y Woese (1985, 1987) han demostrado que las moléculas de RNA ribosómicas (rRNA) 16S y 18S sirven para establecer la relación filogenética entre los distintos organismos, y se han determinado las secuencias de rRNAs 16S/18S de varias arqueobacterias metanógenas, halófilas, termoacidófilas y sulfo-dependientes, además de numerosas eubacterias y eucariotas (Woese y Olsen, 1986), encontrando que los datos presentan una distinción clara entre el reino arqueobacteriano comparado con los eucariotas y eubacterias (Fig. 1).

2.1.2. Halobacterias. Condiciones de crecimiento.

La familia Halobacteriaceae se ha definido tradicionalmente como un grupo homogéneo de arqueobacterias halófilas extremas que comprende el género *Halobacterium*, que contiene dos especies, *H.salinarium* y *H.halobium*, y el género *Halococcus*, que contiene una sola especie, *H.morrhuae* (Torsvik y Dundas, 1982; Oren, 1983; Rodríguez-Valera y col., 1983; Ross y Grant, 1985; Tindall y Trüper, 1986; Torreblanca y col., 1986). En la octava edición del Manual de Bergey *Halobacterium halobium* y *Halobacterium salinarium* se consideraron especies distintas, y posteriormente, en la novena edición se consideraron como una sola especie, junto con la llamada *H.cutirubrum*, bajo el nombre de *H.salinarium* (Tindall y Trüper, 1986). La reclasificación se debió a las similitudes fisiológicas entre las diferentes especies. Recientemente se han propuesto los nuevos géneros

Natronobacterium, *Natronococcus*, *Haloarcula* y *Haloferax* para proporcionar otros ejemplos de arqueobacterias halofílicas extremas (Tindall y col., 1984; Torreblanca y col., 1986; Montero y col., 1988).

Las halobacterias son bacterias Gram negativas, con forma de varilla o irregulares, no formadoras de esporas, que requieren concentraciones de NaCl próximas a la saturación para crecer (alrededor de un 25% en p/v), (Pundak y Eisenberg, 1981a) y que tienen también concentraciones salinas intracelulares muy elevadas (Larsen, 1967). Además de Na⁺ y Cl⁻, el K⁺ es un componente intracelular dominante (Christian y Waltho, 1962), concentrando niveles elevados de este catión dentro de las células (Sanz y col., 1988). Christian y Waltho (1962) concluyeron que la concentración salina intracelular total de una bacteria halofílica es al menos tan grande como la que se necesita para su crecimiento medio, pudiendo ser la razón K⁺/Na⁺ intracelular mucho más grande que la correspondiente razón extracelular. El K⁺ en el medio puede llegar a ser limitante del crecimiento, por lo que las células crecen hasta que todo el K⁺ se asimila (Kushner, 1978).

Se han realizado numerosos estudios sobre "solutos compatibles" en algas y bacterias halofílicas y tolerantes de sal; los solutos compatibles pueden mantener la presión osmótica interna y permiten a las enzimas intracelulares actuar (Brown, 1976; Kushner y Kamekura, 1988). Una de tales sustancias, de gran importancia en ambas eubacterias halofílicas y no halofílicas es la betaína. Imhoff y Rodríguez-Valera (1984) demostraron que la concentración de esta sustancia aumenta con la concentración salina extracelular durante el crecimiento de la célula.

Podría señalarse que las células de una Halobacteriaceae tienen dos propiedades características que son, por un lado, el modelo hexagonal característico presentado

por la superficie de las células y por otro la extrema fragilidad mecánica de las mismas. La suspensión de las células en soluciones con una concentración aproximada de NaCl 2M produce la pérdida completa de rigidez de la pared celular y las células toman forma esférica, y si se disminuye la concentración de NaCl por debajo de 1M se produce una desintegración de la pared celular y la lisis de las células. Todas las halobacterias forman esferas cuando la sal del medio de suspensión disminuye hasta el punto en el que la pared celular pierde su rigidez (Torsvik y Dundas, 1982).

Para resumir, Torsvik y Dundas (1982) han considerado que los criterios siguientes son necesarios y suficientes para incluir una cepa microbiana en las Halobacteriaceae: 1) Debe pertenecer al grupo de microorganismos de las "Arqueobacterias", teniendo ribosomas característicos, en particular los componentes 16S del rRNA. 2) Deben tener células procarióticas halofílicas extremas, necesitando concentraciones salinas más elevadas de 2M para crecer, con Na⁺ o Mg⁺² como cationes extracelulares dominantes y con una concentración salina intracelular de similar fuerza iónica a la del entorno, pero con K⁺ como catión intracelular dominante.

2.1.3.- Localización de los halófilos extremos.

A comienzos de siglo se pudo establecer que el enrojecimiento que se observaba a veces en los salazones se debía a un crecimiento bacteriano; no obstante, aún se tardó unos veinte años en establecer que se trataba de bacterias muy especializadas, que sólo vivían en un medio de elevada concentración salina, y en realidad, la cuestión no está en que toleren elevadas concentraciones de sal, sino en que la necesitan para su crecimiento. Los halófilos extremos están

ampliamente distribuidos en la naturaleza: en salmueras conteniendo concentraciones salinas muy elevadas (Rodríguez-Valera y col., 1981, 1985; Javor, 1984), en lagos de sosa con pHs muy alcalinos (Brisou y col., 1974; Nissenbaum, 1975; Post, 1977), en pieles, o en alimentos salados como se acaba de citar (Larsen, 1967; Dundas, 1977; Kushner, 1985); también son especialmente notables en estanques salinos de evaporación solar, donde se encuentran en tal número que dan color rojo a la salmuera concentrada (Kushner, 1985) (Fig.2). Los lagos salados naturales pueden diferir en su composición iónica, como por ejemplo el Gran Lago Salado, que tiene Na^+ como principal catión, mientras que en el Mar Muerto hay más Mg^{+2} que Na^+ . La respuesta de ciertas halobacterias a las diferentes concentraciones de Na^+ y Mg^{+2} puede variar de acuerdo con el lago particular de donde han sido aislados (Kushner, 1985).

La característica de la coloración roja de los halófilos extremos se debe a la presencia de carotenoides, sin embargo, la pigmentación no tiene relación directa con las propiedades halofílicas de las células (Larsen, 1967). El fotosistema de la bacteriorrodopsina es una característica de las arqueobacterias halofílicas y no se ha detectado en ningún otro organismo (Langworthy, 1985). La bacteriorrodopsina es un pigmento púrpura fotosensible que convierte la luz en energía química, por tanto actúa como una bomba de protones dirigida por la luz, expulsándolos del interior de la célula al medio extracelular y generando un gradiente electroquímico de protones (Renard y Delmelle, 1980), este gradiente sirve para producir ATP. No sólo utilizan el gradiente de protones generado por la luz para producir ATP, sino que lo emplean además para otras funciones como la de mover sus flagelos, que les permiten desplazarse hacia la luz, aunque procurando evitar una excesiva radiación ultravioleta (Hildebrand y Schimz, 1983).

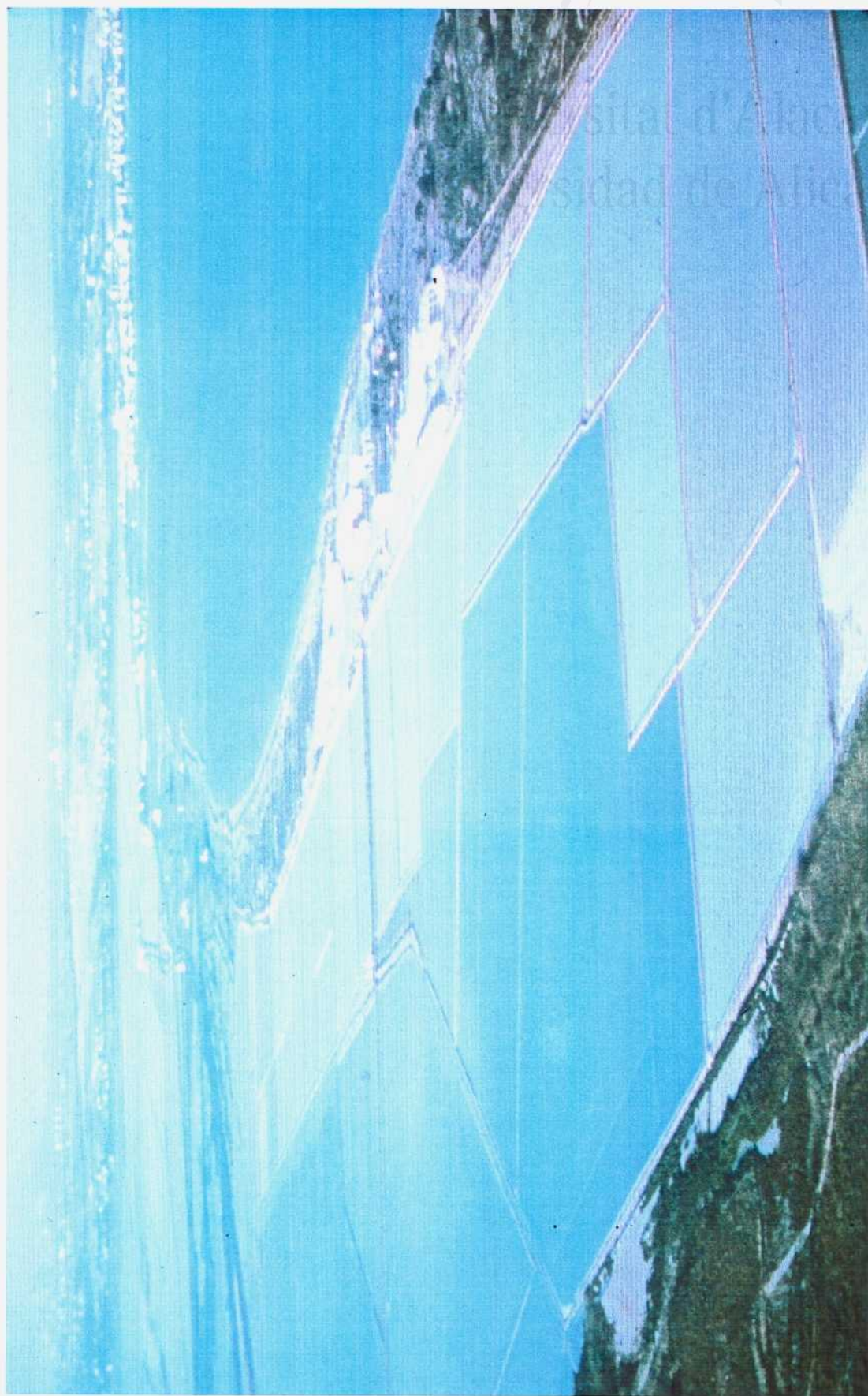


FIGURA 2

2.1.4.- Metabolismo de las halobacterias y comparaciones con los otros linajes.

Catabolismo de hexosas.- Muchos de los halófilos extremos utilizan proteínas y aminoácidos como fuentes de carbono mejor que carbohidratos (Larsen, 1967), sin embargo, Tomlinson y col. (1974) encontraron que *H.saccharovorum* catabolizaba glucosa y galactosa mediante una modificación de la vía de Entner-Doudoroff, y por otra parte, parece ser que *Sulfolobus* y *Thermoplasma* utilizan unos intermediarios no fosforilados de la vía para el catabolismo de glucosa (Fewson, 1986; Danson, 1988). Algunas cepas son capaces de obtener energía por degradación anaeróbica de arginina o citrulina a ornitina (Hartmann y col., 1980), ya que a pesar de ser aerobias las arqueobacterias halofílicas pueden descarboxilar aminoácidos bajo condiciones anaeróbicas, y algunas contienen arginina descarboxilasa, que está implicada en la vía descrita por Hartmann y col. (1980).

Gluconeogénesis.- D'Souza y Altekar (1983) estudiaron la gluconeogénesis en halobacterias, mediante la cual se formaba piruvato a partir de gliceraldehído 3-fosfato y se producían fosfatos de triosa a partir de fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato, en extractos de células de *H.halobium* crecidas en un medio conteniendo sales, peptona y citrato. En estos extractos se detectaron las enzimas fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa, indicando la importancia de la función inversa de la glucólisis en *H.halobium*.

Síntesis de glicerol.- Todas las arqueobacterias tienen lípidos basados en uniones éter, y todos los éteres de glicerol contienen una configuración *sn*-2,3-glicerol que está en contraste directo al *sn*-1,2-glicerol de los glicérolípidos con unión éter de eubacterias y eucariotas. La

síntesis de glicerolípidos arqueobacterianos ha sido revisada recientemente por Langworthy (1985) y De Rosa y col. (1986). Kates y sus colaboradores investigaron el origen de los residuos de glicerol en los lípidos de las arqueobacterias halofílicas (Kates y col., 1970; Kates y Kushwaha, 1978). Cuando *H.cutirubrum* crece en glicerol no hay isomerización aldo-ceto entre dihidroxiacetona y gliceraldehído. Sin embargo, esto puede no ser así cuando crecen con carbohidratos como única fuente de carbono, pudiéndose producir el glicerol a partir de fosfato de glicerol o de la reducción de dihidroxiacetona vía glicerol deshidrogenasa que se detectó en *H.cutirubrum* (Baxter y Gibbons, 1954).

Ciclo del ácido cítrico.- Todas las arqueobacterias pueden convertir piruvato en acetil-CoA, y la enzima implicada es piruvato oxidorreductasa. Las arqueobacterias halofílicas son organismos quimiorganotróficos que pueden suplir sus requisitos energéticos mediante el metabolismo de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados. Algunas cepas pueden utilizar carbohidratos, pero no es una necesidad, y por lo tanto es probable que los halófilos posean un ciclo del ácido cítrico oxidativo. Aitken y Brown (1969) señalaron la presencia de enzimas de este ciclo y del ciclo del glioxilato en *H.halobium*, y Danson y col. (1985) han encontrado las enzimas clave citrato sintasa y succinato tioquinasa en una gama de halófilos clásicos y alcalofílicos. No se han investigado todas las enzimas del ciclo del ácido cítrico en estos organismos, pero todos los nutrientes que son capaces de mantener el crecimiento coinciden en indicar que los halófilos poseen una vía aeróbica oxidativa (Danson, 1988). La situación en las arqueobacterias termoacidófilas es más compleja y puede depender de si el crecimiento es heterotrófico o autotrófico, aeróbico o anaeróbico, aunque por ejemplo se han detectado todas las enzimas de un ciclo del ácido cítrico reductivo en

Thermoproteus neutrophilus (arqueobacteria anaerobia estricta), fijando así CO_2 (Schafer y col., 1986). Las arqueobacterias metanógenas presentan una tercera versión del ciclo del ácido cítrico además de la vía oxidativa de los halófilos y la reductiva de los termoacidófilos sulfodependientes, encontrándose, por un lado, que *M.thermoautotrophicum* posee un ciclo del ácido cítrico reductivo incompleto, dirigiéndose a partir de oxalacetato hasta 2-oxoglutarato vía succinil-CoA (Fuchs y Stupperich, 1978, Jones y col., 1987), y por otro lado, *Methanosarcina barkeri* parece tener un ciclo del ácido cítrico incompleto pero oxidativo, con 2-oxoglutarato sintetizándose vía citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (Daniels y Zeikus, 1978; Weimer y Zeikus, 1979). Así, no se ha encontrado todavía ningún metanógeno con un ciclo completo, tanto oxidativo como reductivo (Danson, 1988).

Transporte de aminoácidos.- El proceso de transporte de aminoácidos en halófilos extremos no se ha investigado con suficiente detalle, siendo éstos fuente de energía habitual y vital para determinar las peculiaridades del metabolismo de estos microorganismos (Matveeva y col., 1987). Los sistemas de transporte estudiados en *H.halobium* para aminoácidos (McDonald y col., 1977) y Ca^{+2} (Belliveau y Lanyi, 1978) utilizan un gradiente de Na^+ como fuente directora, mientras que el gradiente electroquímico de H^+ es la fuente de energía primaria, que puede generarse por luz o por respiración (Belliveau y Lanyi, 1977). Por tanto, esta halobacteria parece ser un organismo muy prometedor en el reconocimiento del transporte de fosfato dirigido por sodio en procariotas (Zoratti y Lanyi, 1987).

Una de las cuestiones centrales es si las arqueobacterias son capaces de conservar energía de la misma forma que lo hacen las eubacterias y los eucariotas, esto es, por la síntesis del ATP mediante la conversión de energía quimiosmótica. Esto ha sido respondido en parte, por la

existencia de halobacterias capaces de fosforilación oxidativa y fotofosforilación, y para el caso de metanógenos, empleando fosforilación de transporte electrónico anaerobio durante la metanogénesis (Lübben y col., 1987).

2.1.5.- Proteínas halofílicas.

Las enzimas halofílicas no sólo son estables a concentraciones de sal elevadas, sino que las requieren para mantener su estructura nativa y su actividad. La naturaleza estructural de su adaptación a tales extremos de salinidad ha sido revisada por Christian y Waltho (1962), Larsen (1967), Kushner (1968), Liebl y col. (1969), Lanyi y Silverman (1972), Lanyi (1974, 1979), Leicht y col. (1978), Kushner (1986), Werber y col. (1986), y otros muchos investigadores.

2.1.5.1.- Requisitos salinos. Estabilidad.

La formación de estructuras "nativas" estables a partir de cadenas polipeptídicas lineales es un proceso espontáneo basado en un balance cuidadoso de interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y electrostáticas (Eisenberg y col., 1978), además se ha sugerido que la sal elimina agua de las proteínas y forma uniones hidrofóbicas particularmente fuertes (von Hippel y Wong, 1964; Lanyi y Stevenson, 1970; Lieberman y Lanyi, 1971). Las proteínas halofílicas parecen

obtener esta característica, aumentando la frecuencia de aminoácidos polares y disminuyendo la de no polares (Lanyi, 1974; Mevarech y col., 1977; Werber y Mevarech, 1978; Werber y col., 1978; Pundak y Eisenberg, 1981a). Este aumento de la frecuencia de aminoácidos polares en proteínas halofílicas es debida a un exceso molar del 16-18 % de aminoácidos cargados negativamente, concretamente grupos glutamato y aspartato (Lieberman y Lanyi, 1972; Eisenberg y col., 1977; Mevarech y col., 1977; Leicht y col., 1978; Werber y col., 1978; Pundak y Eisenberg, 1981a,b; Danson, 1988), mientras que en las proteínas no halofílicas el exceso es sólo del 7-9 %. Anteriormente, Baxter (1959) propuso que el efecto de las sales sobre las enzimas halofílicas consistía en el apantallamiento de las cargas negativas de la molécula protéica por los cationes del medio, que al no ser neutralizadas se repelían electrostáticamente y llevaban a una expansión molecular con desorganización de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. Posteriormente se ha comprobado que estos residuos de aminoácidos ácidos aumentan la estabilización de la proteína compitiendo con la sal y originando una capa de hidratación apropiada a fuerzas iónicas elevadas, de forma que unen alrededor de siete moléculas de agua por residuo, mientras que los demás aminoácidos sólo unen de dos a cuatro moléculas de agua por residuo (Kuntz, 1971; Pundak y Eisenberg, 1981b).

Otro mecanismo propuesto para el efecto salino en las enzimas halofílicas está basado en el poder "salting-out" de ciertas sales, como NaCl. Parece que las sales que poseen este carácter (Lanyi y Stevenson, 1970; Lieberman y Lanyi, 1971; Higa y Cazzulo, 1975) tienden a estabilizar la conformación nativa de las enzimas halofílicas más que las del tipo "salting-in". En presencia de concentraciones elevadas de NaCl, las cadenas polipeptídicas de una enzima con extremo no polar pueden formar uniones hidrofóbicas estables (Lanyi, 1969; Lanyi y Stevenson, 1970; Leicht y

col., 1978). Otras sales, tales como NaNO_3 y especialmente NaClO_4 , no estabilizan bien la estructura del agua y por esto no mantienen la actividad enzimática máxima (Lanyi y Stevenson, 1970).

En los años 50 comenzó el estudio de las propiedades de las enzimas de bacterias halofílicas extremas, con la demostración, por parte de Robinson y Katznelson (1953), de la necesidad de la presencia de una concentración salina elevada para la actividad y estabilidad de aspartato aminotransferasa de *H.salinarium*, seguida por el estudio de Baxter y Gibbons (1954) sobre glicerol deshidrogenasa del mismo microorganismo. A estos estudios siguieron otros, esencialmente del grupo de Gibbons, que confirmaron la idea de que las enzimas aisladas de bacterias halófilas extremas necesitaban concentraciones elevadas de sal para mostrar su actividad enzimática y para ser estables, conservando su estructura nativa (Larsen, 1962, 1967; Kushner, 1968; Lanyi, 1974). Estas enzimas halofílicas se comportan de modo diferente en lo que se refiere a la efectividad de las distintas sales como activadores o estabilizadores (Lanyi, 1974; Cazzulo, 1975). Prácticamente todas las enzimas de bacterias halofílicas descritas en la bibliografía tuvieron necesidades salinas o tolerancias más elevadas que las correspondientes enzimas de otros tipos de organismos (Larsen, 1962, 1967; Brown, 1964; Hochstein y Dalton, 1968; Aitken y Brown, 1969), y en cambio, a bajas concentraciones salinas la mayoría de las enzimas mostraron poca o ninguna actividad (Larsen, 1967).

Con isocitrato deshidrogenasa de *H.cutirubrum* la estabilización completa se obtuvo cuando el tampón contenía más de 3M de NaCl. A concentraciones más bajas de sal el grado de protección fue proporcional a la concentración de NaCl. Por ejemplo, con NaCl 2.2M se perdió alrededor del 50% de actividad en 20 horas, y con 1.2M se perdió toda la actividad en tres horas (Hubbard y Miller, 1969). Según

Cazzulo y Vidal (1972), el NaCl fue la sal estabilizadora más efectiva entre una serie de estudiadas por ellos para la enzima málica de *H.cutirubrum*, el KCl fue algo menos efectivo y NH_4Cl fue casi completamente inefectivo. Es curioso que el activador más efectivo, NH_4Cl , fue inefectivo como estabilizador, mientras que el estabilizador más efectivo, NaCl, no activó completamente.

Holmes y Halvorson (1963) encontraron la forma de reactivar algunas enzimas halofílicas que habían sido desnaturalizadas por eliminación de sal, pero según Hubbard y Miller (1972) pocas enzimas podían ser renaturalizadas completamente después de la desnaturalización. El hecho de que algunas enzimas halofílicas sean protegidas por sus sustratos frente a la inactivación a baja concentración salina podría significar que la acción estabilizadora de la sal estaría restringida a una región pequeña de la molécula enzimática (Cazzulo, 1975), como es el caso de la ornitina carbamoiltransferasa de *H.salinarium* (Dundas, 1972), que se mantiene estable en presencia de cualquiera de sus tres sustratos, citrulina, ornitina o carbamoilfosfato (siendo este último el que produce menos efecto). Cuando una enzima inactiva está expuesta durante mucho tiempo a bajas concentraciones salinas, la cantidad de enzima que puede reactivarse normalmente disminuye con el tiempo (Mevarech y Neumann, 1977).

La velocidad de inactivación depende de la naturaleza y concentración de la sal, teniendo en cuenta que los tres componentes intracelulares Na^+ , K^+ y Cl^- juegan un papel importante en las células, manteniendo a las enzimas en un estado activado (Larsen, 1967). La mayoría de los experimentos relacionados con la activación y estabilización de enzimas halofílicas *in vitro* se realizaron con K^+ y Na^+ , que son los principales cationes intra- y extracelulares, respectivamente (Higa y col., 1974). Sin embargo, los cationes divalentes proporcionan cierta estabilización en sistemas

particulares de enzimas como NADH deshidrogenasa, y en algunos casos los cationes divalentes son incluso mejores que K^+ ó Na^+ como estabilizadores (Higa y col., 1974). *In vivo* es difícil averiguar el papel de los cationes divalentes en el mantenimiento de las estructuras nativas de las enzimas halofílicas. Lanyi y Silverman (1972) demostraron que, mientras el K^+ parece estar libre en la célula, el Mg^{+2} probablemente esté unido a los lípidos de membrana y a las proteínas ácidas (Reistad, 1970) presentes en los halófilos extremos. Por tanto, la eficacia de los cationes divalentes como estabilizadores a bajas concentraciones salinas, sugiere que la protección de cargas por los cationes es un factor importante para mantener las estructuras nativas de algunas enzimas, siendo una excepción la GDH de *H. cutirubrum*, en la cual los cationes divalentes fueron muy poco eficaces en comparación con NaCl y KCl (Higa y col., 1974).

En general, las enzimas siguen cinéticas de inactivación de primer orden, obteniéndose rectas cuando se hacen representaciones del logaritmo de la actividad residual frente al tiempo de incubación en presencia de concentración salina baja (0.05 - 0.5 M) (Baxter, 1959; Cazzulo, 1972; Lieberman y Lanyi, 1972); de tales rectas se puede obtener la vida media de la enzima en las condiciones experimentales empleadas. En muchos casos (Holmes y Halvorson, 1965; Hubbard y Miller, 1969) se ha podido comprobar que la inactivación por eliminación de sal va acompañada por un aumento de volumen de la molécula enzimática, manifestada por una disminución del coeficiente de sedimentación o del volumen de elución en Sephadex G-200, por lo que se produce una expansión molecular con desaparición de la estructura secundaria de α -hélice y exposición de grupos normalmente inaccesibles. Esto es semejante a lo que ocurre con la desnaturalización de enzimas no halofílicas por agentes como el calor, urea, clorhidrato de guanidina, etc. (Lanyi, 1974).

Mevarech y Neumann (1977) observaron que cuando la concentración salina disminuía, la malato deshidrogenasa de *Halobacterium* del Mar Muerto perdía su actividad enzimática, recuperándola completamente al aumentar la fuerza iónica. Para esta enzima en estado nativo, el contenido de α -hélice fue el 33%, mientras que a 0.5M de NaCl desapareció completamente (Fundak y Eisenberg, 1981a), en cambio, incluso en ausencia de sal, la NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto mantuvo parte de su estructura secundaria, el contenido de α -hélice disminuyó del 58% al 17% pero no desapareció (Fundak y Eisenberg, 1981a; Fundak y col., 1981).

Para esta glutamato deshidrogenasa no se encontraron condiciones bajo las cuales se pudiera anular la inactivación dependiente de sales (Leicht y col., 1978), y cuando se disminuyó la concentración salina se produjo un desplazamiento al rojo en los espectros de emisión de fluorescencia de esta enzima, debido a la exposición de residuos triptofanilos a un entorno más polar que en la enzima nativa, ocurriendo algo similar con malato deshidrogenasa halofílica (Mevarech y col., 1977). Esto hace pensar que la exposición de residuos de triptófano, y probablemente de otros residuos aromáticos, podría ser una propiedad general de las enzimas halofílicas, que está relacionada con la pérdida de estructura secundaria y refleja un cambio conformacional grande al disminuir la concentración salina (Leicht y col., 1978).

En un sistema de tres componentes tales como proteína-agua-sal, el conocimiento de las interacciones preferenciales de las proteínas con los componentes del disolvente puede dar una idea del efecto que producen los ligandos en la estabilidad y solubilidad de dichas proteínas (Arakawa y Timasheff, 1984). No hay duda de que, además de los contactos entre residuos de aminoácidos intra- e intermoleculares, las interacciones de una enzima con el disolvente también

juegan un papel decisivo (Eisenberg y col., 1978). Como consecuencia, todo esto se podría resumir en tres características: a) la estabilidad de las enzimas halofílicas estudiadas es muy grande a concentraciones multimolares de sales del tipo "salting-out" (Eisenberg y col., 1978); b) se desestabilizan a bajas concentraciones de sal, lo que va unido a una pérdida de la estructura α -hélice y c) se caracterizan por un exceso de cargas negativas sobre positivas cuando se comparan con sus homólogas no halofílicas (Eisenberg y col., 1977; Leicht y col., 1978; Werber y col., 1978).

2.1.5.2.- Requisitos salinos. Actividad.



Los primeros estudios realizados, principalmente por los grupos de Gibbons (1957), de Larsen (1962, 1967) y de Brown (1964) demostraron que la mayoría de las enzimas aisladas de halobacterias se activaban por sal, y otros sugirieron que el papel de las sales en la activación podía diferir del papel de las sales en la estabilización (Hubbard y Miller, 1969; Cazzulo y Vidal, 1972; Mevarech y Neumann, 1977). En algunos casos, la enzima es completamente inactiva en ausencia de sal y alcanza su actividad máxima en presencia de elevadas concentraciones salinas (Baxter, 1959), éstas son las enzimas que realmente pueden llamarse halofílicas; otras enzimas de halófilos extremos se activan por sal, con máxima activación entre 0.5 M y 1.5 M, siendo parcialmente inhibidas por concentraciones más elevadas; finalmente algunas enzimas halófilas extremas se inhiben por concentraciones crecientes de sal, y en tales casos, si bien la actividad máxima se obtiene en presencia de una concentración salina muy baja, una parte de la actividad se

conserva aún en presencia de una concentración de sal 3-4 M (Cazzulo, 1975). La isocitrato deshidrogenasa de *H.salinarium* estudiada por Baxter y Gibbons (1956) tuvo una concentración óptima de 1.2 M para NaCl y entre 2-4 M para KCl, mientras que Higa y col. (1974) encontraron un valor óptimo de 0.1M a 0.4M de NaCl para la enzima de *H.cutirubrum*. Aunque hay diferencias en la concentración óptima de sal de las isocitrato deshidrogenasas halofílicas estudiadas por diferentes autores, hay un acuerdo general de que la [sal] óptima de la enzima está por debajo de la concentración salina a la que los organismos pueden sobrevivir.

La mayoría de las enzimas estudiadas responden prácticamente igual a KCl que a NaCl, las principales sales dentro y fuera de la célula, respectivamente, mientras que otras presentan mayor actividad en presencia de KCl que de NaCl, como debería esperarse de enzimas intracelulares. La alanina deshidrogenasa de *H.salinarium*, purificada prácticamente a homogeneidad, necesitó concentraciones salinas elevadas para su actividad (Keradjopoulos y Holldorf, 1979), pero los efectos de iones específicos fueron bastante diferentes en las reacciones oxidativa y reductiva catalizadas por esta enzima. Así, el KCl, NaCl, RbCl y CsCl tuvieron prácticamente el mismo efecto en la aminación reductiva de piruvato, pero KCl fue más efectivo que las otras sales en la desaminación oxidativa de alanina por esta enzima, y no se observó actividad en presencia de NaCl; por su parte, la piruvato quinasa de *H.cutirubrum* (de Médicis y col., 1982) fue más activa a concentraciones elevadas de KCl que de NaCl.

Ciertas enzimas que requieren concentraciones elevadas de sales monovalentes para su actividad pueden activarse a concentraciones mucho más bajas de cationes divalentes, tales como Mg^{+2} , Mn^{+2} ó Ca^{+2} ó de cationes polivalentes, tales como espermidina o espermina (Higa y col., 1974;

Lanyi, 1974); como ejemplos pueden incluirse la citrato sintasa (Cazzulo, 1973) y aspartato carbamoiltransferasa (Norberg y col., 1973), ambas de *H.cutirubrum*. El CaCl_2 , entre cuatro sales probadas (CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl y KCl), fue el mejor activador de la GDH de *H.cutirubrum*, y en cambio presentó inhibición a concentraciones elevadas de cationes monovalentes (Higa y col., 1974). También hay que tener en cuenta la naturaleza del anión acompañante. Así, en los casos mejor estudiados se observó que el orden de efectividad de los aniones era Cl^- , H_2PO_4^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^- , SCN^- (Hochstein y Dalton, 1968; Lanyi y Stevenson, 1969, 1970; Lieberman y Lanyi, 1971, 1972), orden igual al de la efectividad de los aniones como agentes capaces de producir "salting-out" (Cazzulo, 1975).

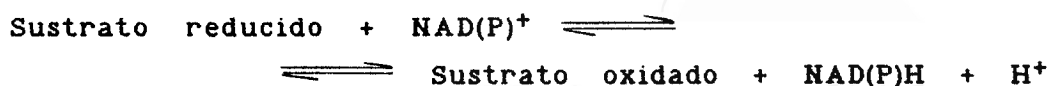
2.2. DESHIDROGENASAS PIRIDIN DEPENDIENTES.

2.2.1.- Generalidades.

En las células, las deshidrogenasas piridín dependientes catalizan numerosas reacciones de oxidación-reducción y utilizan NAD^+ o NADP^+ como coenzimas. Algunas enzimas pueden reaccionar con ambos nucleótidos de nicotinamida, otras, en cambio, únicamente pueden trabajar con uno de los dos, y actúan en diferentes aspectos del metabolismo (Dalziel, 1975). Los nucleótidos de nicotinamida son coenzimas, y no grupos prostéticos, pudiéndose considerar como sustratos desde el punto de vista cinético, que forman también compuestos reversibles y estables con deshidrogenasas. Nunca se ha demostrado la existencia de una reacción de oxidación-reducción entre una deshidrogenasa y una coenzima en ausencia completa del otro sustrato (Dalziel, 1975).

Por regla general, las deshidrogenasas que utilizan NAD^+ como coenzima son enzimas catabólicas, que producen energía e intervienen de manera primordial en la respiración (es decir, en la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno), mientras que las NADP -dependientes intervienen principalmente en la transferencia de electrones desde los intermediarios del catabolismo hasta los intermediarios de la biosíntesis.

La función de la coenzima es aceptar dos electrones y un protón del sustrato en su centro redox, oxidando a dicho sustrato:



Los dos electrones de NAD(P)H pueden transferirse a una segunda molécula de sustrato que se reducirá. Estas reacciones comprenden la transferencia reversible de dos equivalentes reductores 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 (Dalziel, 1975).

Además, en estas reacciones se ha demostrado la existencia de estereoespecificidad respecto al carbono C-4 proquiral de la coenzima y los centros quirales o proquirales de los sustratos (Popják, 1970), y esto implica que la transferencia del hidrógeno ocurre dentro de un complejo ternario de enzima, coenzima y sustrato (Dalziel, 1975). Esta estereoquímica se estudió utilizando coenzimas y sustratos marcados. Se emplearon técnicas de fluorescencia, dispersión óptica rotatoria y ultracentrifugación para el estudio de la unión de sustratos y coenzimas, así como del número de centros activos. Las enzimas que pertenecen a esta clase se clasificaron en dos grupos: las estereoespecíficas-A que transfieren el hidruro al lado A (cara R) del anillo de piridina de la coenzima, y las estereoespecíficas-B que lo transfieren al lado B (cara S). En el caso de la forma reducida de las coenzimas, los hidrógenos del lado-A y lado-B corresponden a hidrógenos *pro-R* y *pro-S*, respectivamente (You, 1982).

Durante las pasadas tres décadas se estuvo analizando la estereoespecificidad de las enzimas que pertenecen a esta clase debido a que este aspecto es una de las propiedades más conservadas que poseen y además proporciona información fundamental para la elucidación de su mecanismo de acción

(You, 1982). Como resultado, ahora se conocen las estereoespecificidades de más de 150 deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de nicotinamida. Como ejemplos se podrían citar las enzimas malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa o lactato deshidrogenasa que presentan especificidad A, mientras que glutamato deshidrogenasa presenta especificidad B. Se pueden considerar, por tanto, una serie de generalizaciones respecto a la estereoespecificidad, a partir de las propiedades de las deshidrogenasas unidas a NAD^+ y NADP^+ :

a) La estereoespecificidad de una reacción particular es independiente de la fuente de la enzima que la cataliza.

b) Cuando una enzima puede utilizar NAD^+ ó NADP^+ (o sus formas reducidas), la estereoespecificidad de la reacción es la misma con ambas coenzimas.

c) Cuando una enzima reacciona con una gama de sustratos, la estereoespecificidad de la transferencia de hidrógeno es la misma con cada sustrato (Görisch y col., 1985).

El método más utilizado para medir la actividad de las deshidrogenasas de nucleótidos de piridina es el método espectrofotométrico, que se basa en las diferencias de absorbancia entre las formas oxidada y reducida de los nucleótidos a 340nm. Tanto NADH como NADPH muestran el mismo espectro de absorción, y mientras que la absorbancia a 340nm es nula para las formas oxidadas, las especies reducidas presentan un máximo de absorbancia a esa longitud de onda.

En muchos mecanismos cinéticos para deshidrogenasas, la coenzima se combina en primer lugar con la enzima, y se libera en último término. Este orden es coherente con el hecho de que la unión con la coenzima provoca un cambio de conformación en la molécula de la enzima. Probablemente, ese cambio haga posible la unión del sustrato, que sin él no puede acceder a su centro específico (Sund, 1968). En el

dominio de unión con la coenzima, tan similar entre todas las deshidrogenasas, se pueden distinguir dos subdominios, que se parecen bastante en la distribución de los elementos de estructura secundaria; cada uno de estos subdominios tiene un centro de unión para cada uno de los nucleótidos que componen el NAD^+ y el NADP^+ .

Tanto el peso molecular como la estructura de la subunidad es otra característica a tener en cuenta entre las deshidrogenasas. Los pesos moleculares de las deshidrogenasas varían desde 23000 daltons para dihidrofolato reductasa de hígado de pollo (Kaufman y Gardiner, 1966) y manitol-1-P deshidrogenasa de *E.coli* (Klungsoyr, 1966) hasta dos millones para glutamato deshidrogenasa de hígado de vaca (Sund, 1963). La mayoría de estos pesos están en el rango de 50000 a 200000 daltons (Sund, 1968).

Generalmente, las deshidrogenasas están compuestas de más de una cadena polipeptídica como, por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo que consta de dos cadenas polipeptídicas, la enzima de levadura contiene cuatro cadenas (Hersh, 1962) y las glutamato deshidrogenasas, hasta 40 (Sund, 1963; Fahien y col., 1965). La mayoría de las deshidrogenasas contienen cadenas polipeptídicas con pesos moleculares entre 14000 y 50000 daltons. En general, un centro activo se asigna a cada uno de los centros de unión de la coenzima. Esto plantea la cuestión de cuál es la unidad más pequeña enzimáticamente activa de las deshidrogenasas que contienen dos o más cadenas polipeptídicas. Parece razonable suponer que cada cadena polipeptídica debería ser enzimáticamente activa, dado que la cadena polipeptídica sencilla puede poseer la misma conformación que la molécula asociada.

La renaturalización de deshidrogenasas después de la inactivación bajo condiciones desnaturalizantes se ha conseguido con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutamato

deshidrogenasa, glicerol fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (Sund, 1968). En otros casos, (por ejemplo, lactato deshidrogenasa de corazón bovino) donde se observa la disociación en subunidades inactivas, se debe suponer que la estructura tridimensional específica, que es esencial para la actividad catalítica, es estable sólo en el estado asociado. Por otra parte, la glutamato deshidrogenasa de hígado bovino puede disociarse en subunidades que todavía son activas pero presentan actividades específicas diferentes (Sund, 1968). En principio, también existe la posibilidad de que varias cadenas participen en un centro activo, de manera que sólo la molécula asociada puede manifestar actividad enzimática. En la mayor parte de las deshidrogenasas estudiadas se dedujo que los centros de unión de la coenzima y los centros activos podían actuar independientemente unos de otros, aunque no siempre se cumplía (Sund, 1968).

2.2.2.- Deshidrogenasas halofilicas.

Las proteínas y enzimas de halófilos son activas a concentraciones de sal multimolares, que también necesitan para mantener su estabilidad (Lanyi, 1974). A bajas concentraciones salinas, el proceso de inactivación está acompañado por un cambio de conformación grande y por disociación de las enzimas en subunidades. En el caso de malato deshidrogenasa de *Halobacterium* del Mar Muerto, por ejemplo, la disociación pudo ser anulada y la actividad recuperada sólo mediante un aumento de la concentración salina (Mevarech y Neumann, 1977). De la naturaleza de los cambios estructurales producidos, así como de la exposición de residuos triptofanilos a un entorno más polar y de la

pérdida de estructura α -hélice, se puede deducir que la conformación nativa de las deshidrogenasas es más compacta y más ordenada que la inactiva (Eisenberg y col., 1977). Presumiblemente, a concentraciones salinas bajas, la repulsión electrostática entre las cargas negativas de la superficie de la enzima y/o el área de contacto entre sus subunidades sea la causa principal de la pérdida de estructura nativa, llevando a la inactivación (Eisenberg y col., 1977). La carga neta elevada que reside en las deshidrogenasas halofílicas, como resultado del exceso significativo de residuos de aminoácidos ácidos sobre básicos, evita la agregación y la precipitación a fuerza iónica elevada bajo condiciones fisiológicas. Este exceso de residuos ácidos refleja la composición de residuos de proteínas citoplasmáticas de los organismos halofílicos (Reistad, 1970).

Los valores de K_m de una misma enzima de distintas especies halofílicas son diferentes, y la variación de la concentración salina produce cambios en los parámetros cinéticos (Eisenberg y col., 1977). Por otro lado, los valores de estos parámetros varían al cambiar el tipo de sal (Keradjopoulos y Holldorf, 1979).

Se estudiaron varias cepas de tres tipos de *Halobacterium* (Keradjopoulos y Holldorf, 1977) en relación a la temperatura de crecimiento, encontrándose que ninguna de las deshidrogenasas crecía por encima de los 50°C; en cambio, se pudo considerar que, prácticamente todas las deshidrogenasas halofílicas que estaban implicadas en el metabolismo del nitrógeno presentaron una temperatura máxima para su actividad catalítica entre 55 y 70°C, por lo que son termofílicas, siendo estos valores más elevados que la temperatura máxima requerida para el crecimiento (Keradjopoulos y Holldorf, 1977).

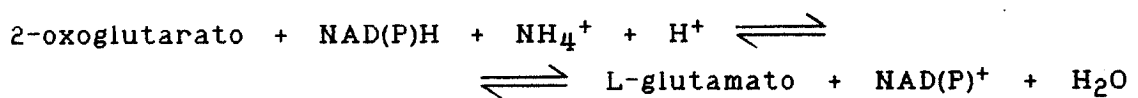
La dificultad de purificación de las deshidrogenasas halofilicas es otra propiedad característica. La precipitación por disoluciones orgánicas produjo una pérdida de actividad. Mevarech y col. (1976) y Eisenberg y col. (1977) desarrollaron un procedimiento de purificación en el que, en todas las etapas, la concentración salina se mantenía muy alta para evitar la inactivación de las deshidrogenasas halofilicas.

En este Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, además de las dos enzimas glutamato deshidrogenasas objeto de este Trabajo, se están estudiando otras enzimas: alanina deshidrogenasa (Lucendo, 1986; Sahagún, 1988), malato deshidrogenasa (Cadenas, 1985; Cano, 1987) e isocitrato deshidrogenasa (Jurado, 1985), todas ellas de la especie *Halobacterium halobium* (mutante incoloro).

2.3. GLUTAMATO DESHIDROGENASAS.

2.3.1.- Función.

Las glutamato deshidrogenasas (EC.1.4.1.2-4) catalizan la interconversión de 2-oxoglutarato y L-glutamato según la reacción reversible



La reversibilidad de la desaminación proporciona un mecanismo enzimático importante para la interconversión de α -amino y 2-oxo ácidos, acoplada a la formación y fijación de amonio (Sallach y Fahien, 1969; Smith y col., 1975). Debido a la posición central que tanto el glutamato como el 2-oxoglutarato ocupan en el metabolismo, y a la capacidad de dichos compuestos de formar parte de muchos tipos de vías, estas enzimas son de vital importancia.

Las glutamato deshidrogenasas proporcionan una ruta para la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos y así, una conexión entre el metabolismo de carbohidratos y el de aminoácidos (Smith y col., 1975; Botton y Msatef, 1983). Aunque tal como está escrita la reacción directa es indudablemente el principal papel de la enzima en muchos organismos, sobre todo microorganismos (Engel y Dalziel, 1967), la reacción inversa (oxidación de glutamato) es importante en algunos organismos, en tejidos especializados

(Smith y col., 1975; Gore, 1981) y en varias especies de parásitos (Ling y col., 1986).

Hay por lo menos tres tipos de glutamato deshidrogenasas que difieren en la especificidad de coenzima: las específicas de NAD^+ , las de NADP^+ , y las que pueden funcionar con ambas. A partir de ahora, a las dos primeras se les llamará NAD-GDH o NADP-GDH, para abreviar.

Estas enzimas varían, no sólo en su especificidad de coenzima, sino también en otras propiedades, tales como: inducción y represión de su síntesis por metabolitos, regulación de las actividades enzimáticas por di- y trifosfatos purín nucleósidos (ADP, GDP, ATP, GTP), así como por otros ligandos, y en sus propiedades moleculares (Smith y col., 1975). El papel que juegan estas enzimas en procesos metabólicos puede variar de un organismo a otro (Valle y col., 1984).

2.3.2.- Distribución y especificidad de coenzima.

Las GDHs están distribuidas ampliamente en hongos, bacterias, plantas y animales. Mientras que las enzimas de origen animal utilizan NAD^+ ó NADP^+ (Frieden, 1963b; Eisenberg y col., 1976), las procedentes de otras fuentes son específicas para una de las dos coenzimas; además, va aumentando el número de organismos en los cuales existen dos enzimas distintas, una que requiere NAD^+ y otra NADP^+ , como es el caso de varias especies de hongos, entre los que cabe destacar *Fusarium* (Sanwal, 1961), *Neurospora crassa* (Sanwal y Lata, 1961), *Piricularia oryzae* (Kato y col., 1962); o en otras especies como *Thiobacillus novellus* (LéJohn y McCrea,

1968), *Hydrogenomonas H16* (Krâmer, 1970), *Saccharomyces cerevisiae* (Roon y Even, 1973), *Pseudomonas aeruginosa* (Janssen y col., 1980), *Nitrobacter agilis* (Kumar y Nicholas, 1984), *Trypanosoma cruzi* (Urbina y Azavache, 1984) o *Halobacterium halobium* (mutante incoloro, objeto de este Trabajo).

Además de la regulación de la actividad enzimática por nucleótidos de purina, en *Neurospora* y levadura, las concentraciones relativas de NAD-GDH y NADP-GDH parecen ser importantes en el control metabólico. Por ejemplo, en *Neurospora*, se demostró que el amonio reprimía la NAD-GDH e inducía la NADP-GDH, pero el glutamato tuvo el efecto opuesto (Sanwal y Lata, 1962). Resultados similares se obtuvieron en levadura (Hollenberg y col., 1970). Estos y otros argumentos similares llevaron a la conclusión de que la enzima NAD-GDH (EC. 1.4.1.3) está implicada principalmente en la oxidación del glutamato, mientras que la NADP-GDH (EC. 1.4.1.4) es responsable de su biosíntesis.

En el caso de la GDH bovina (Smith y col., 1975) la razón de actividad entre la desaminación y la aminación fue de 1:15, valores similares a los obtenidos para la larva de insecto (Male y Storey, 1982) y para la anémona *A.xanthogrammica* (Male y Storey, 1983), que fue de 1:10, sugiriendo una función principal de la enzima en la biosíntesis del glutamato. Las GDHs que tienen papeles principales en la oxidación de glutamato presentan razones de actividad que favorecen mucho la reacción de desaminación, como el caso de músculo de ala de insecto (1:6) (Bursell, 1975) o el músculo de calamar (1:1) (Storey y col., 1978).

El fenómeno de regulación y de economía de energía sugieren que cuando diferentes enzimas que catalizan la misma reacción se encuentran dentro del mismo organismo, tales enzimas deben poseer diferentes funciones. Las

deshidrogenasas NAD-específicas generan NADH, que entonces es oxidado mediante la cadena de transporte de electrones para producir ATP. El NADPH, producido a partir de las deshidrogenasas NADP-específicas, es utilizado principalmente como la potencia reductora para la biosíntesis (LéJohn y McCrea, 1968).

Como se ha dicho anteriormente, las GDHs están distribuidas ampliamente. Las procedentes de tejidos animales son activadas por ADP e inhibidas por GTP; no obstante, existen diferencias cuantitativas entre estas enzimas de distintos tejidos (Smith y col., 1975).

El primer estudio realizado sobre distribución y propiedades de glutamato deshidrogenasas en hongos fue realizado por LéJohn (1971), encontrando que algunas enzimas de los superiores eran moduladas por nucleótidos purínicos, pero generalmente de forma diferente a la regulación sufrida por GDHs de fuentes animales.

En general, las enzimas de animales poseen, además de los centros activos, al menos dos tipos de centros alostéricos. NAD^+ y los nucleótidos de purina se unen a uno de ellos, y un segundo centro es específico para los nucleótidos de piridina reducidos (Sallach y Fahien, 1969). Hay muy pocas enzimas no animales que posean centros alostéricos. La NAD-GDH de *N.crassa* (Sanwal y Lata, 1961) está inhibida por nucleótidos de purina; sin embargo, ya que la inhibición es competitiva respecto a las coenzimas, parece probable que ésta surja de la unión de los nucleótidos de purina al centro activo (Sallach y Fahien, 1969). La adición de ADP produce un desplazamiento grande en el pH óptimo de la enzima de calamar (Storey y col., 1978), mientras que sólo se han observado pequeños cambios con la GDH de otras fuentes (Goldin y Frieden, 1971). El porcentaje de activación de la GDH del músculo de aleta de calamar por ADP

es más grande que para la enzima de otras fuentes animales (Bursell, 1975).

En la Tabla 1 aparecen distintas glutamato deshidrogenasas encontradas en algunos organismos. Entre ellas aparece la de *S.typhimurium* (Coulton y Kapoor, 1973a,b) y *E.coli* (Sakamoto y col., 1975), que poseen únicamente la enzima biosintética, específica de NADP⁺, y pueden metabolizar glutamato para suministro de energía por otras rutas. La enzima procedente del anaerobio *Clostridium* SB₄ (Winnacker y Barker, 1970) es específica de NAD⁺; probablemente es responsable de la producción de 2-oxoglutarato, compuesto necesario como sustrato para las reacciones de transaminación y para el ciclo del ácido cítrico. No se detectó actividad con NADP⁺ en este organismo ni en otros, como se puede apreciar en la Tabla anterior. En mamíferos, las concentraciones más elevadas de GDH se han encontrado, generalmente, en hígado. La enzima está localizada en la mitocondria y, debido a la facilidad con que se aísla, se presume que está específicamente en la matriz mitocondrial (Smith y col., 1975); aunque hay algunos autores que la han encontrado asociada a fracciones nucleares purificadas (Di Prisco y Garofano, 1974; Camardella y col., 1976).

Varias especies de *Bacillus* (Phibbs y Bernlohr, 1971) carecen de actividad GDH y es probable que la alanina u otras aminoácido deshidrogenasas de estas especies sean las responsables de la síntesis de aminoácidos a partir de amonio e intermediarios metabólicos. *Mycoplasma laidlawii* (Yarrison y col., 1972) es una bacteria que posee un genoma muy pequeño, carece de paredes celulares, y contiene una GDH que utiliza ambas coenzimas, igual que ocurre, por ejemplo, con una bacteria fijadora de nitrógeno como *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) o una anaerobia estricta, *B.fragilis* (Yamamoto y col., 1987).

TABLA 1

Distribución de glutamato deshidrogenasas en fuentes no animales según su especificidad de coenzima.

ORGANISMO	NAD ⁺	NADP ⁺	Referencia
<i>Nitrosomonas europaea</i>	-	+	Hooper y col. (1967)
<i>Brevibacterium flavum</i>	-	+	Shiio y Ozaki (1970)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	-	+	Tempest y col. (1970)
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	Phibbs y Bernlohr (1971)
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	+	Phibbs y Bernlohr (1971)
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	Coulton y Kapoor (1973a)
<i>Thermophilic bacillus</i>	-	+	Epstein y Grossowicz (1975)
<i>E. coli</i>	-	+	Sakamoto y col. (1975)
<i>H. halobium</i> y <i>H. cutirubrum</i>	-	+	Keradjopoulos y Holldorf (1977)
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	Hemmila y Mäntsälä (1978)
<i>Candida utilis</i>	-	+	Hemmings (1978)
<i>Halobacterium</i> Mar Muerto	-	+	Leicht y col. (1978)
<i>Proteus inconstans</i>	-	+	Shimizu y col. (1979)
<i>Pseudomonas</i> AM1	-	+	Bellion y Tan (1984)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	+	Misono y col. (1985)
<i>Hyphomicrobium X</i>	-	+	Duchars y Attwood (1987)
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	-	+	Weining y Nicholas (1987)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	+	-	Bachofen y Neeracher (1968)
<i>B. emersonii</i>	+	-	LéJohn (1968)
<i>Clostridium</i> SB ₄	+	-	Winnacker y Barker (1970)

ORGANISMO (contin.)	NAD ⁺	NADP ⁺	Referencia
<i>H. salinarium</i>	+	-	Keradjopoulos y Holldorf (1977)
<i>Clostridium symbiosum</i>	+	-	Rice y col. (1985)
<i>Phycomyces</i>	+	-	van Laere (1988)
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	Phibbs y Bernlohr (1971)
<i>Bacillus mycoides</i>	-	-	Phibbs y Bernlohr (1971)
<i>Bacillus subtilis</i> 168T	-	-	Phibbs y Bernlohr (1971)
<i>Fusarium</i>	+	+	Sanwal (1961)
<i>Neurospora crassa</i>	+	+	Sanwal y Lata (1961)
<i>Thiobacillus novellus</i>	+	+	LéJohn (1967) LéJohn y col. (1968)
<i>Hydrogenomonas H16</i>	+	+	Krāmer (1970)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	Roon y Even (1973)
<i>Clostridium kluyverii</i>	+	+	Shimizu y col. (1979)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	Janssen y col. (1980) Joannou y col. (1988)
<i>Nitrobacter agilis</i>	+	+	Kumar y Nicholas (1984)
<i>Halobacterium halobium</i> (mutante incoloro)	+	+	(este Trabajo)

Enzimas procedentes de bacterias que son activas con NAD⁺ y NADP⁺:

<i>Mycoplasma laidlawii</i>	+	Yarrison y col. (1972)
<i>B. subtilis</i> PCI 219	+	Kimura y col. (1977)
<i>P. asaccharolyticus</i>	+	Hornby y Engel (1984)
<i>Azospirillum brasilense</i>	+	Maulik y Ghosh (1986)
<i>B. fragilis</i>	+	Yamamoto y col. (1987)

De todas las GDHs encontradas de fuentes no animales, únicamente las bacterianas de *T.novellus* (LéJohn, 1967; LéJohn y McCrea, 1968; LéJohn y col., 1968), *Rhodospirillum rubrum* (Bachofen y Neeracher, 1968), y *Halobacterium halobium* (objeto de este Trabajo), y también la de la espóra *Phycomyces* (van Laere, 1988), son afectadas por nucleótidos purínicos, pero de una manera distinta a como son reguladas las enzimas de animales, como ya se ha citado. Además, las GDHs bacterianas generalmente presentan una K_m muy alta para el amonio ($>1mM$) (Tyler, 1978) y no pueden funcionar eficazmente cuando éste está presente a una concentración limitante del crecimiento, como por ejemplo, durante la fijación de N_2 por una bacteria. En tales situaciones, la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa juegan un papel crítico en la asimilación de amonio, como ocurre en *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986).

Dentro del grupo de las arqueobacterias, y concretamente de los metanógenos, en cepas de *Methanosarcina* sp. no se ha podido demostrar la presencia de NAD(P)-GDH (Jones y col., 1987); en cambio, se ha detectado la existencia de glutamato deshidrogenasa y alanina deshidrogenasa en halobacterias. La estructura cuaternaria de la GDH halobacteriana sugiere una relación específica con la enzima de origen vegetal (Jones y col., 1987).

2.3.3.- Centro de la coenzima.

Cross y Fisher (1970) dividieron el centro activo de la coenzima en dos subcentros, uno específico para la porción amida de la nicotinamida y el otro para la mitad adenosina difosfato. Los análogos del NAD^+ : 3-acetilpiridina y

piridin-3-aldehído, son utilizados por GDH bovina con mayor eficacia que el NAD^+ propiamente (Cross y Fisher, 1970). Esto se ha atribuido al hecho de que el análogo 3-acetilpiridina es incapaz de unirse en el subcentro amida; así, ya que la disociación de coenzimas reducidas puede ser la etapa limitante de la velocidad en la oxidación del glutamato, la velocidad se ve aumentada con la coenzima modificada.

El mononucleótido de nicotinamida no es un cofactor para la GDH bovina (Pfleiderer y col., 1963); sin embargo, la sustitución de la parte de adenina de las coenzimas por hipoxantina, citidina o nicotinamida produce un derivado que funciona como coenzima, aunque con una disminución de eficacia del 91, 53 y 3 % (relativa a la actividad con NAD^+), respectivamente. Estos datos, que dan una idea de la carencia de especificidad en el centro adenosina difosfato, muestran que aunque la mitad adenosina de la coenzima puede alterarse de varias formas, debe estar presente de algún modo para que el análogo funcione como cofactor (Pfleiderer y col., 1963).

Alex y Bell (1980) por un lado, y Male y Storey (1982) por otro, demostraron que los compuestos de tionicotinamida eran buenos análogos de NADP^+ y NAD^+ , y por tanto, buenos sustratos de GDH bovina. Ambos compuestos eran inhibidores competitivos de las coenzimas respectivas y presentaban cooperatividad negativa con NADP^+ ó NAD^+ como sustrato variable, comportándose del mismo modo respecto a los cambios conformacionales que ocurrían con las coenzimas naturales. Hornby y Engel (1984) ensayaron con otros análogos de coenzimas, y vieron que aunque NAD^+ y desamino- NAD^+ eran muy similares cinéticamente para la GDH de *P.asaccharolyticus*, el compuesto acetilpiridín-adenina dinucleótido es bastante diferente. Podría haber una relación interesante entre la enzima bovina y la de *P.asaccharolyticus* en la reacción de desaminación ya que comparten muchas similitudes respecto a

la unión de aminoácidos, pero presentan afinidades diferentes para la coenzima oxidada (Hornby y Engel, 1984).

Gore y Greenwood (1972) indicaron que la NADP-GDH de *Neurospora* utiliza ambos análogos de NADP⁺, el 3-acetilpiridina y desamino-NADP⁺. En ambos casos, la V_{máx} es mucho más baja que con NADP⁺ y, además, el análogo desamino se une menos efectivamente. La NADP-GDH de *Neurospora* se inactiva rápidamente cuando reacciona con tetranitrometanol (Blumenthal y Smith, 1975). La inactivación se evita completamente en presencia de coenzima (NADP⁺) o NMN (mononucleótido de nicotinamida), pero no por sustrato, NADH ó 2'-monofosfoadenosina-5'-difosforibosa. Se considera que tanto el NMN como el 2'-monofosfoadenosina-5'-difosforibosa actúan como inhibidores competitivos de NADP⁺ en la oxidación del glutamato.

2.3.4.- Centro para sustratos. Inhibidores competitivos.

Los experimentos realizados por Caughey y col. (1957) para mapear el centro activo de la GDH bovina establecieron que ciertos ácidos dicarboxílicos, tales como glutarato o isoftalato y un grupo de m-halobenzoatos, eran inhibidores competitivos potentes. Un aspecto común de estos compuestos es la presencia de dos grupos carboxilatos o uno y un elemento altamente electronegativo (Rogers y col., 1972). El examen de los modelos tridimensionales mostró que en el caso de los inhibidores cíclicos más efectivos, los dos sustituyentes (que atraen electrones) están separados, aproximadamente, por 7.5 Å, y que la cadena de dicarboxilatos puede lograr una conformación similar. El isoftalato, un inhibidor competitivo extremadamente potente ($K_i = 5.6 \times 10^{-4} M$) para la GDH bovina, mantiene rígidamente los dos grupos

carboxilos a un espaciado de 7.5 Å, explicándose así su eficacia de unión. Por tanto, se postuló que el centro de unión del sustrato debe contener dos grupos cargados positivamente con dicho espaciado (Caughey y col., 1957).

Se ha ensayado la actividad de la enzima de varias fuentes (Tomkins y col., 1961; Sanwal y Lata, 1961) utilizando aminoácidos monocarboxílicos como sustratos en lugar de L-glutamato, y otros α -cetoácidos en lugar de 2-oxoglutarato. Sin embargo, sólo la enzima de hígado bovino ha demostrado interaccionar con otros aminoácidos distintos de glutamato (Prough y col., 1972).

La utilización de L- α -amino- γ -nitraminobutirato y L-treo- γ -metilglutamato en lugar del sustrato normal de GDH bovina en la desaminación oxidativa por Hornby y col. (1985) representa un estudio similar al de Engel y Dalziel (1969) con norvalina. Sin embargo, los análogos utilizados por Hornby y col. comparten más características que los aminoácidos monocarboxílicos incluyendo norvalina (Struck y Sizer, 1960). Todos son utilizados por GDH a una velocidad más baja que el sistema glutamato-2-oxoglutarato. Además, las reacciones que utilizan sustratos monocarboxilatos presentan un pH óptimo 1-1,5 unidades más elevado que el observado para la desaminación del L-glutamato, y los valores de K_m son mucho más elevados. Sin embargo, los valores de $V_{m\acute{a}x}$ para estos sustratos son tan altos como los de L-glutamato, medidos ambos a su pH óptimo respectivo (Fisher, 1985).

Los aminoácidos como sustratos alternativos ensayados para NADP-GDH de *N. crassa* (Sanwal y Lata, 1961) mostraron ser inefectivos como sustratos. D-glutamato es un fuerte inhibidor competitivo tanto de la enzima de hígado bovino como de *Neurospora* (Jallon e Iwatsubo, 1973; Gore y Greenwood, 1975).

Como en el caso de muchas enzimas que pueden utilizar o el grupo amida de la glutamina o el amonio, Blumenthal y Smith (1975) han encontrado que la glutamina puede servir como dador de nitrógeno tanto para GDH bovina como para NADP-GDH de *Neurospora* a una velocidad \approx 40% del amonio. Sólo en el caso de la NADP-GDH de *Neurospora*, la asparagina puede donar su grupo amida \approx al 10% de la velocidad del amonio. La velocidad óptima para la utilización de amidas es a pH 8.4, mientras que para el amonio se sitúa entre 7.6 y 7.8. El ADP aumenta la velocidad de la aminación reductiva con glutamina aproximadamente tres veces con GDH bovina, un efecto similar al que se encontró con amonio. La NAD-GDH de *Neurospora* no utiliza glutamina o asparagina como donador de nitrógeno.

La GDH de *A.xanthogrammica* (Male y Storey, 1983) mostró gran capacidad para utilizar L-glutamina en vez de amonio en la aminación de 2-oxoglutarato. La actividad de GDH unida a glutamina puede tener un significado fisiológico como alternativa para la incorporación de amonio en los aminoácidos (Male y Storey, 1983).

2.3.5.- Propiedades moleculares.

2.3.5.1.- Agregación.

Se ha demostrado que la polimerización de las GDHs procedentes de hígado bovino o porcino tiene lugar a concentraciones de proteína superiores a 0.1mg/ml (Smith y col., 1975; Fisher, 1985). La reacción de polimerización está afectada por numerosos ligandos, los cuales influyen también en la velocidad de la reacción catalítica.

Sustancias tales como GTP (Wolff, 1962; Frieden y Colman, 1967), tiroxina (Wolff, 1962) y dietilestilbestrol (Tomkins y col., 1961, 1962) que inhiben la GDH, favorecen la disgregación en presencia de la forma reducida de la coenzima (Frieden y Colman, 1967; Huang y Frieden, 1972), es decir, producen disociación de la enzima al monómero. Por otro lado, el ADP, que aumenta la actividad enzimática, favorece la agregación en presencia de NADH (Frieden, 1959; Frieden y Colman, 1967; Bailey y col., 1982). Se sabe que las GDHs de diferentes fuentes animales muestran grandes diferencias en su capacidad para polimerizar (Kubo y col., 1959; Frieden, 1962; Dessen y Pantaloni, 1969). En cambio, sólo se han detectado polimerizaciones de fuentes no animales en la NADP-GDH de *Nitrobacter agilis* (Kumar y Nicholas, 1984), dando así una explicación a la aparición de dos bandas electroforéticas principales y una más pequeña en las preparaciones purificadas, en comparación con la banda sencilla obtenida de los extractos crudos. Todos estos estudios proporcionaron mucha ayuda a la hora de determinar la estructura cuaternaria de una proteína. Sin embargo, en vista del hecho de que la GDH procedente de rata (cinética y estructuralmente similar a la enzima bovina) no es capaz de polimerizar, parece poco probable que el fenómeno de polimerización desempeñe un papel fisiológico importante (Smith y col., 1975).

Por debajo de 0.1mg/ml, la GDH de hígado bovino está predominantemente en una forma de peso molecular 330000 daltons que contiene seis cadenas polipeptídicas idénticas (subunidades). Muchas de las evidencias sugieren que esta forma, llamada oligómero o hexámero, es la unidad más pequeña enzimáticamente activa (Smith y col., 1975; Eisenberg y col., 1976), y se puede considerar que hay un equilibrio reversible de asociación-disociación entre hexámeros y oligómeros superiores (Mazzini y Favilla, 1987).

2.3.5.2.- Estructura del oligómero. Peso molecular.

A partir de los siguientes resultados se ha demostrado que la enzima bovina está compuesta de cadenas polipeptídicas idénticas que no están unidas covalentemente:

Alanina es el único aminoácido NH_2 -terminal y treonina el único COOH -terminal de la enzima (Jirgensons, 1961).

El peso molecular de la subunidad fue de 55390 daltons, calculado a partir de la secuencia (Moon y Smith, 1973), que está de acuerdo con el obtenido por equilibrio de sedimentación (Cassman y Schachman, 1971; Landon y col., 1971).

La GDH de hígado de pollo tiene tres residuos adicionales en su cadena polipeptídica (Moon y col., 1973), mientras que la NADP-GDH de *Neurospora crassa* posee 50 residuos menos que la enzima bovina. La cadena de la NADP-GDH de *Neurospora* parece similar en tamaño a la de las enzimas dependientes de NADP^+ procedentes de levadura de panadero y *E.coli*, a la de *Mycoplasma laidlawii* que posee especificidad doble y posiblemente también a la de hígado de rata (Smith y col., 1975).

La NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto (Leicht y col., 1978) tiene un peso molecular de 213000 daltons, calculado mediante experimentos de equilibrio de sedimentación. La subunidad presentó un peso molecular de 53500 daltons, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida; por lo tanto, esta enzima parece estar compuesta de 4 subunidades de idéntico tamaño. Aunque este método puede conducir a resultados erróneos cuando se trata de proteínas halofílicas (Werber y Mevarech, 1978), en este caso el error es sólo del 9%, por lo que se consideran válidos dichos resultados. Leicht y col. consideraron que, al menos con respecto a la estequiometría de las subunidades, la GDH

halofílica se parece más estrechamente a las enzimas análogas de plantas que a las de procarióticos.

La mayoría de las GDHs tienen un tamaño alrededor de 300000 daltons, pero hay algunas excepciones, como pueden ser ambas enzimas de *T.novellus* (LéJohn y col., 1968), que tienen pesos oligoméricos alrededor de 120000 daltons, demostrados mediante estudios de sedimentación. Sin embargo, la NAD-GDH de *N.crassa* (Veronese y col., 1974) ha demostrado ser bastante anómala, con una estructura tetramérica y un peso molecular oligomérico de 480000 daltons por análisis de equilibrio de sedimentación. Este peso molecular también lo poseen las NAD-GDHs de *Candida utilis* (Hemmings, 1980) y *Saccharomyces* (Uno y col., 1984). La menor que se ha encontrado hasta la fecha es la NAD-GDH de *Phycomyces* (van Laere, 1988), con un peso molecular de 98000 daltons.

2.3.5.3.- Estabilidad, desnaturalización y disociación en subunidades.

Muchas GDHs animales son más estables en tampones que contienen un anión polivalente, tales como fosfato, que en aquellos que contienen un catión monovalente como Tris (Frieden, 1963b; Fisher, 1985). La pérdida de actividad en Tris está acompañada por un cambio conformacional considerable. La desnaturalización se evita por NaCl (Bitensky y col., 1965), sugiriendo que las fuerzas electrostáticas ayudan a retener la integridad de la molécula de proteína.

Las coenzimas reducidas muestran efectos bifásicos en la desnaturalización. Por debajo de 0.01mM, NADH y NADPH

aumentan la velocidad de inactivación, mientras que a concentraciones más altas, la proteína se estabiliza (Frieden, 1959, 1963a). En presencia de NADH, dietilstilbestrol, iones zinc o GTP aumentan la velocidad de desnaturalización (Bitensky y col., 1965; Smith y Bell, 1985), mientras que el ADP protege a la enzima en condiciones más suaves de inactivación (Frieden, 1963a; Smith y Bell, 1985). El óxido de deuterio es útil para investigar las fuerzas que estabilizan la asociación de las subunidades (Henderson y col., 1970). El D₂O produjo disociación de las fuerzas poliméricas de GDH y a concentraciones elevadas del óxido se formaron polímeros más grandes. Cross y Fisher (1966) encontraron que ningún residuo de fenilalanina, triptófano o tirosina están expuestos al disolvente cuando la forma polimérica se disocia a formas monoméricas, pero están expuestas durante la disociación del monómero a la subunidad.

En tampón fosfato 0.2M (pH 7.6), la GDH bovina es estable durante una hora a 41°C, pero pierde actividad rápida e irreversiblemente a 50°C (Olson y Anfinsen, 1953), a menos que se añada sulfato sódico al tampón (Kubo y col., 1959). Las GDHs de microorganismos varían mucho en cuanto a su estabilidad. La NADP-GDH de *Neurospora crassa* (Ashby y col., 1974), con el pH experimenta un cambio conformacional reversible. Mientras que esta enzima mantiene su actividad durante varios días a 50°C y pH 7.2 (Barratt y Strickland, 1963), la NAD-GDH se inactiva rápidamente a temperaturas elevadas y bajas fuerzas iónicas, pero es más estable en presencia de NAD⁺ y el inhibidor competitivo isoftalato (Veronese y col., 1974). Las NAD-GDHs de hongos inferiores también son inestables (LéJohn y Stevenson, 1970), pero las aisladas de *Clostridium* SB₄ (Winnacker y Barker, 1970) y *Peptococcus aerogenes* (Johnson y Westlake, 1972) se mantienen hasta alrededor de 50°C, y también las enzimas NADP-dependientes de *Salmonella* (Coulton y Kapoor, 1973a) y

E.coli (Veronese y col., 1975). Esta última se desnaturaliza a 65°C, y los sustratos NADP⁺ ó 2-oxoglutarato no tienen ningún efecto protector frente a la desnaturalización de la enzima. La NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto (Leicht y col., 1978) se mantiene estable a 65°C, al menos durante varias horas, cuando la concentración de NaCl es elevada (4.3M). La NADP-GDH procedente de *L.fermentum* (Misono y col., 1985) es estable hasta 70°C, y a esta temperatura se mantiene invariable durante 10 min. en un rango de pHs entre 6.0 y 8.0. Estas dos últimas enzimas citadas son de las más termoestables que se han visto hasta la fecha.

La disociación de GDH bovina en subunidades está siempre acompañada por una pérdida de actividad, y algunas veces de desplegamiento de las cadenas polipeptídicas. Cuando el pH se eleva de 10 a 12 o se disminuye de 5 a 2, la disociación está acompañada por cambios en el espectro ultravioleta, los cuales son característicos de la perturbación de los tirosilos cromóforos (Fisher y col., 1962a,b). Una interpretación de estos resultados es que algunas de las fuerzas que mantienen unidas las subunidades implican enlaces de hidrógeno entre grupos -OH fenólicos y -COOH de cadenas laterales (Fisher y col., 1962a,b). Por el contrario, la disgregación de formas polimerizadas de la proteína al hexámero activo no está acompañada por ningún cambio espectral (Cross y Fisher, 1966).

El clorhidrato de guanidina a 2M disocia a la enzima bovina (Bell y Bell, 1984; Inoue y col., 1984). Cuando la concentración de urea aumenta hasta 4M ocurre una transición cooperativa, produciendo la disociación en subunidades (Kubo y col., 1959). En cambio, las NADP-GDHs de *Salmonella* (Coulton y Kapoor, 1973a) y *E.coli* (Veronese y col., 1975) son más resistentes a estos agentes desnaturalizantes.

En el caso de NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto (Leicht y col., 1978) se observó un desplazamiento al rojo

del máximo de emisión de fluorescencia cuando se disminuyó la concentración salina, lo que significó una exposición de residuos triptófano de la enzima a un entorno más polar que los de la enzima nativa.

2.3.5.4.- Composición de aminoácidos y centro activo.

Las composiciones de aminoácidos de varias GDHs son relevantemente similares, y distintas de las composiciones de la mayor parte de otras deshidrogenasas; por ejemplo, la relación arginina/lisina en GDHs es relativamente alta (Smith y col., 1975; Julliard y Smith, 1979).

Para GDH bovina se ha calculado que el 58% de los residuos tirosilo, 22% de triptofanilo y 75% de fenilalanina están ocultos en el interior de las moléculas y son inaccesibles a compuestos pequeños tales como glucosa y D₂O (Cross y Fisher, 1966). De los 36 tioles del oligómero, 26 reaccionan fácilmente con iones plata, mientras que los 10 restantes reaccionan a una velocidad muy lenta (Rogers, 1972). La unión del NADH aumenta la disponibilidad de los 10 tioles últimos.

Triptófano

Appella y Tomkins (1966) detectaron 4 residuos de triptófano por subunidad en la enzima de hígado bovino mediante un análisis espectral y valoración con N-bromosuccinimida; en cambio, se obtuvo un valor de 3.4 mediante valoración colorimétrica con *p*-dimetil-aminobenzaldehído (Landon y col., 1971), mientras que se localizaron 3 residuos de triptófano durante la determinación de la secuencia (Smith y col., 1970).

Arginina

Se utilizó 1,2-ciclohexanodiona y butano-2,3-diona para modificar residuos de arginina en GDH de hígado bovino (Blumenthal y Smith, 1975), *Neurospora* (Blumenthal y Smith, 1975; Austen y Smith, 1976) y *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mântsalâ, 1978), y la extensión de la modificación varió con el tipo de enzima. La NADP-GDH de *Neurospora* se inactivó completamente después de la reacción de dos residuos de arginina con 1,2-ciclohexanodiona (Blumenthal y Smith, 1975; Austen y Smith, 1976). La reacción de este compuesto con un sólo residuo de arginina aumentó la K_m para la coenzima alrededor de dos veces, pero cambió muy poco la K_m para el glutamato. Al cabo de 60 minutos de reacción la actividad enzimática se perdió completamente con la modificación de un total de dos residuos de arginina por subunidad. La reacción de GDH bovina con 1,2-ciclohexanodiona produjo una pérdida rápida del 45% de la actividad enzimática, aproximadamente, y la modificación de alrededor de 1.5 residuos de arginina por subunidad. Un tratamiento más prolongado dió como resultado la reacción de cuatro residuos adicionales de arginina por subunidad, pero sin efecto posterior en la actividad residual, y la K_m para la coenzima aumentó alrededor de 1.5 veces. Austen y Smith (1976) obtuvieron el péptido modificado a partir de la enzima de *Neurospora* y demostraron que era un residuo del centro activo. El mononucleótido de nicotinamida, un inhibidor competitivo para la enzima nativa de *Neurospora*, no inhibió a la GDH con un residuo de arginina modificado. Este descubrimiento confirmó que la arginina modificada está en (o cerca de) el centro de unión de la enzima para nicotinamida.

Aunque la enzima de *Neurospora* no se protegió de la modificación por 1,2-ciclohexanodiona por la presencia de coenzima o sustrato, la enzima de bovino fue parcialmente protegida por NAD^+ ó $NADP^+$ (Austen y Smith, 1976). En la enzima de *Bacillus*, el NADPH protegió completamente de la

modificación, aunque el NADH no. Debido a esto, Hëmmila y Mäntsalä (1978) concluyeron que el grupo guanidinio de la arginina interacciona sólo con el grupo fosfato de NADPH cargado negativamente. Sin embargo, se ha encontrado que las enzimas unidas a NADPH son muy específicas para su coenzima y el grupo fosfato es muy necesario para cualquier unión.

Cisteína

No se han detectado puentes disulfuro en glutamato deshidrogenasas. La estimación del contenido de grupos tioles en la enzima bovina dió un valor de 6.0 por valoración con DTNB en hidrocioruro de guanidina (Bitensky y col., 1965). Las secuencias completas de la enzima bovina y la de pollo dieron 6 residuos de cisteína (Smith y col., 1970) y 7 residuos (Moon y Smith, 1973), respectivamente. Se podría decir que las GDHs de hígado bovino y de pollo son casi idénticas en varias propiedades, con las secuencias de aminoácidos que difieren sólo en 30 residuos (Moon y col., 1973) y que incluyen los 3 residuos adicionales en el NH₂-terminal de la GDH de pollo. La NADP-GDH de *Neurospora* es homóloga a la enzima de vertebrados (Austen y col., 1977). Veronese y col. (1975) encontraron homología en este sentido entre la NADP-enzima de *E.coli* y las procedentes de hongos, como *Neurospora*. Blumenthal y Smith (1973) acetilaron todos los grupos tioles de la NADP-GDH de *Neurospora* sin efecto en la actividad. En NAD-GDH de la misma fuente, Degani y col. (1974) modificaron un grupo -SH por subunidad.

Histidina

Hucho y col. (1973) y otros investigadores utilizaron la fotooxidación (con piridoxal-5'-fosfato ó Rosa de Bengala como fotosensibilizadores) ó modificación por dietilpirocarbonato para probar el papel de la histidina en la enzima de hígado bovino. Observaron que la destrucción de un residuo sencillo de histidina por subunidad daba un 30% de

inactivación, una pérdida por parte de las proteínas de su capacidad para polimerizar y la anulación del efecto GTP.

Gore y col. (1980) encontraron que la NADP-GDH de *N. crassa* se inactiva completamente con dietilpirocarbonato. La modificación de un residuo de histidina por subunidad proporciona la estabilización de la proteína en una conformación inactiva, pero activable reversiblemente.

Lisina

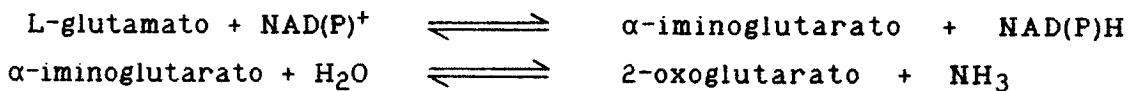
Como muchas deshidrogenasas dependientes de nicotinamida, las GDHs contienen un residuo de lisina reactivo dentro de una secuencia primaria de aminoácidos hidrofóbicos. En la enzima de *Neurospora*, bovino y *Bacillus*, el NADPH y 2-oxoglutarato más NADPH protegen esta lisina de la reacción con piridoxal-5'-fosfato. Además de este residuo de lisina hay una segunda lisina reactiva que reacciona con glioxal, un inhibidor competitivo de la unión de 2-oxoglutarato. Esta segunda lisina se ha conservado en todas las deshidrogenasas secuenciadas (Gore, 1981).

Tirosina

Fisher (1973) fue capaz de identificar un residuo de tirosina en la enzima de hígado bovino, detectado porque el espectro aparece desplazado al azul cuando las coenzimas se unen para formar un complejo binario. La nitración de la enzima con tetranitrometano produce la modificación de residuos de tirosina y, por tanto, una pérdida de actividad enzimática. En la NADP-GDH de *Neurospora*, la nitración de un residuo sencillo conduce a la pérdida de actividad, y estudios de protección han apuntado que este residuo está implicado en la unión de la parte de nicotinamida de NADP⁺.

2.3.6.- Mecanismo químico de reacción.

Probablemente, la reacción global catalizada por estas enzimas proceda a través de varias etapas intermedias:



Hochreiter y col. (1972) propusieron que el α -iminoglutarato era un intermediario en la reacción de glutamato deshidrogenasa. La incubación de la enzima con 2-oxoglutarato y amonio, en ausencia de NAD(P)H, condujo a la formación de L-iminoglutarato, el cual fue atrapado por reducción con borohidruro sódico o ditionito sódico para dar L-glutamato. La misma incubación con la exclusión de la enzima dió una mezcla de las formas D y L del glutamato, indicando que se necesitaba la presencia de dicha enzima para que hubiera estereoespecificidad. Los inhibidores competitivos del sustrato 2-oxoglutarato, tales como glutarato, hidroxiglutarato, D-glutamato y L-glutamato disminuyeron la cantidad de α -iminoglutarato unido en la misma extensión con que ellos inhibían la reacción catalítica normal con NAD(P)H. Estos resultados sugirieron que se formaba una base de Schiff entre el amonio y el 2-oxoglutarato en el centro activo de la enzima. Es posible que el complejo E-NAD(P)H- α -iminoglutarato sea responsable del desplazamiento al azul del espectro del complejo E-NAD(P)H-2-oxoglutarato observado por Fisher y col. (1987).

Los estudios de modificación de aminoácidos han demostrado que GDH bovina tiene dos lisinas muy reactivas, que son los residuos 126 (Piszkiewicz y col., 1970) y 27 (Rasched y col., 1974), siendo interesante considerar el posible papel del grupo amino esencial de las lisinas en un

esquema de reacción que implica al α -iminoglutarato (Fig.3). Ambas lisinas están implicadas de alguna manera no especificada en la unión del sustrato. Sin embargo, ya que el pK aparente está en el rango de 7.6-8.0, es poco probable que cualquiera de ellas represente uno de los dos grupos catiónicos requeridos para la unión del carboxilato, ya que estaría, aproximadamente, un 50% no protonada al pH óptimo para la reducción del 2-oxoglutarato y casi completamente desprotonada al pH óptimo para la oxidación del glutamato (Smith y col., 1975). Srinivasan y Fisher (1986) han sugerido que el grupo carboxilato del sustrato forma una unión iónica con un grupo de la enzima cargado positivamente, mejor que una unión de hidrógeno con un grupo ácido neutro de la enzima.

Una hipótesis más atractiva implicaría la condensación con 2-oxoglutarato del grupo ϵ -amino descargado para formar una base de Schiff en el centro activo de la enzima (Smith y col., 1975; Srinivasan y col., 1988), con la eliminación de una molécula de agua. El ataque del amonio en un intermediario tal como una base de Schiff produciría L-iminoglutarato unido, el cual podría entonces ser reducido por el NAD(P)H para producir L-glutamato, implicando así la reacción etapas distintas para la deshidratación y la reducción.

En la reacción inversa, la etapa inicial sería la eliminación del ión hidruro del glutamato, presumiblemente mediado por una base de la enzima, y la transferencia a la coenzima para formar iminoglutamato, seguido por la reacción de este intermediario con el grupo ϵ -amino de Lys-126 para producir la base de Schiff con pérdida de amonio. La hidrólisis de la base de Schiff, la cual puede estar catalizada por un grupo protonado tal como un grupo ϵ -amino, generaría entonces 2-oxoglutarato (Fig. 3). Por supuesto, este mecanismo hipotético está basado teniendo en cuenta que el α -iminoglutarato es realmente un intermediario



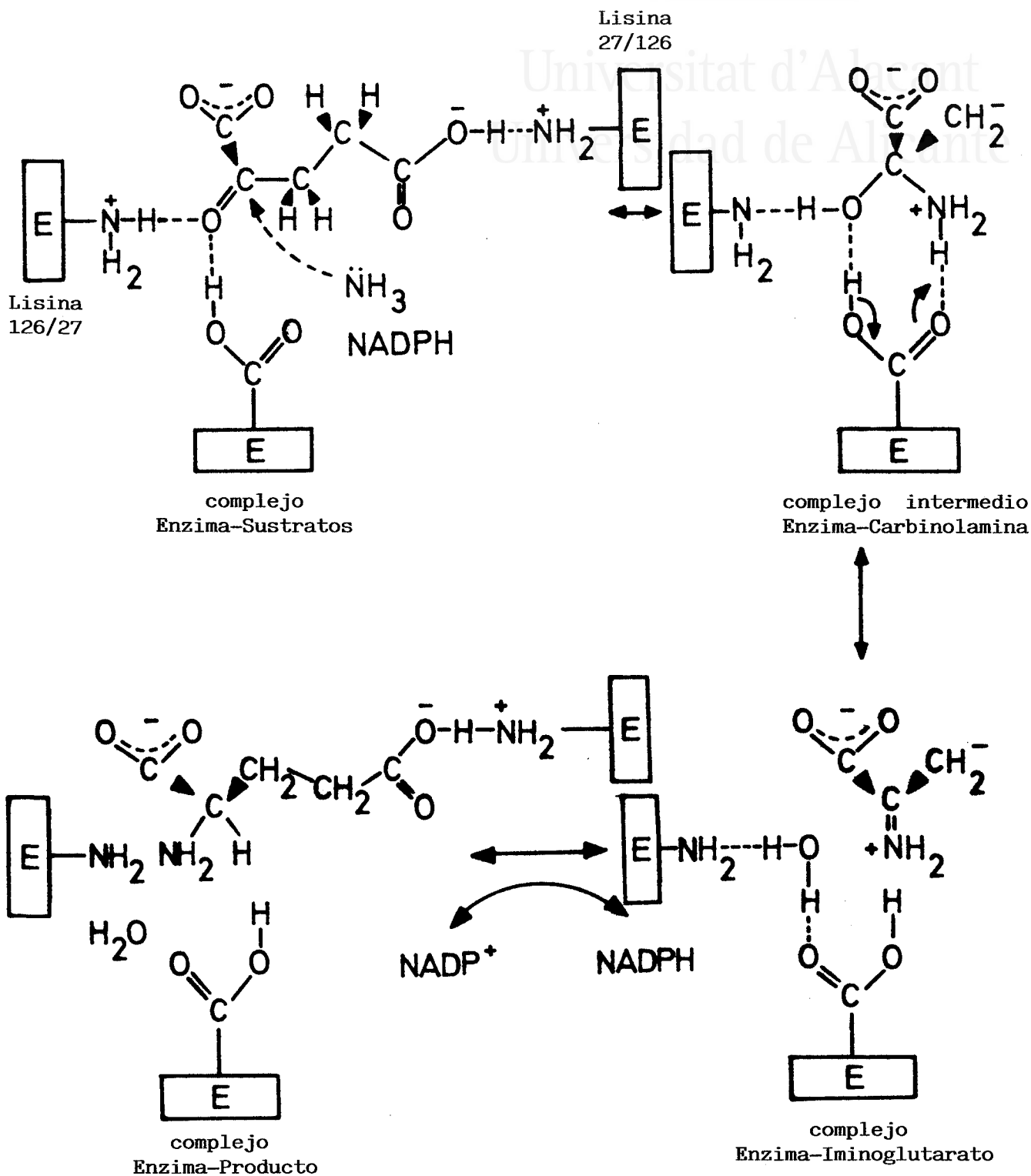


Figura 3 : Esquema propuesto para el mecanismo químico seguido por la GDH en la conversión de 2-oxoglutarato y amonio a L-glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa (Gore, 1981, adaptado de Rife y Cleland, 1980a).

de la reacción. Se ha demostrado que los ácidos α -imino son intermediarios en las reacciones catalizadas por L- y D-aminoácido oxidasas que contienen flavina (Hafner y Wellner, 1971).

Más recientemente, Rife y Cleland (1980b) han utilizado estudios de pH para probar el mecanismo de la reacción y han implicado la participación de un intermediario carbinolamina formado mediante un ataque directo por amonio a 2-oxo-glutarato (Fig. 3). En este esquema propuesto por Rife y Cleland, el protón del grupo hidroxilo de la carbinolamina viene de una de las lisinas catalíticas (126 ó 27). La eliminación de agua da α -iminoglutarato que es reducido por NAD(P)H a L-glutamato.

Tanto la Lys-126 como la 27 se han conservado en todas las GDHs que utilizan NADP⁺, cuya estructura primaria se conoce (Smith y col., 1975), y en cambio, otros residuos específicos no se han asignado definitivamente al centro activo de la enzima mediante los estudios de modificación (Rife y Cleland, 1980b).

2.4. MECANISMOS CINÉTICOS.

Uno de los problemas fundamentales de la Enzimología es la elucidación del mecanismo cinético por el cual actúan las enzimas. Los estudios de las reacciones catalizadas por enzimas comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Toda reacción catalizada por una enzima ocurre a través de la formación de un complejo activo formado entre el sustrato y la enzima (Dixon y Webb, 1979b).

Los mecanismos cinéticos se pueden clasificar en dos grupos principales:

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

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

En los mecanismos ping-pong la enzima oscila entre dos o más formas estables, mientras que en los secuenciales sólo hay una forma estable de la enzima (enzima libre) (Cleland, 1970). Los mecanismos secuenciales se denominan: **ordenados** si los sustratos se combinan y se liberan de la enzima en un orden obligado, o **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 manera que en

estado estacionario estas etapas están esencialmente en equilibrio termodinámico (Cleland,1970).

A continuación se exponen diferentes tipos de estudios cinéticos que se pueden realizar para la determinación del mecanismo cinético que sigue un enzima.

2.4.1.- Estudios de velocidad inicial.

En sistemas bireactantes una determinación de los patrones de velocidad inicial implica la variación de la concentración de un sustrato a diferentes niveles fijos del otro sustrato y en ausencia de productos. La mayoría de los mecanismos SECUENCIALES con dos sustratos muestran una ecuación de velocidad de la forma:

$$v = VAB / (K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB) \quad (1)$$

donde v es la velocidad inicial, A y B son las concentraciones de los sustratos y V y K 's son constantes. Las representaciones de v versus $[A]$ a $[B] = \text{cte}$, o de v versus $[B]$ a $[A] = \text{cte}$ son hipérbolas y no dan mucha información, pero una representación de $1/v$ versus $1/[A]$ o $1/[B]$ bajo estas condiciones es una línea recta, y si se realizan las representaciones recíprocas a varios niveles de B , o viceversa, se obtiene un conjunto de rectas que intersectan a la izquierda del eje vertical. El punto de corte tiene una coordenada horizontal de $-1/(K_{ia})$ cuando A es el sustrato variable (y $-K_a/(K_{ia}K_b)$ cuando B es variable) y una coordenada vertical $1/V[1-(K_a)/(K_{ia})]$. Es obvio que el patrón se cortará por encima del eje horizontal cuando $K_{ia} > K_a$, por debajo cuando $K_{ia} < K_a$, y en el eje cuando $K_{ia} = K_a$.

Los mecanismos birreactantes PING-PONG producen una ecuación de velocidad similar a la ecuación (1), salvo que no existe el término constante ($K_{1a}K_b$) en el denominador. El resultado es que el patrón de la representación recíproca es paralelo.

Mientras que un patrón intersecante definitivamente interseca, siempre existe una duda de si un patrón paralelo es verdaderamente paralelo o muy ligeramente intersecante ($K_{1a} \ll K_a$). Por tanto, se debe ser cauteloso en la interpretación de un patrón paralelo como un mecanismo PING-PONG en ausencia de otros datos que lo corroboren. Otro patrón de velocidad inicial es el llamado ORDENADO DE EQUILIBRIO RAPIDO, que es el resultado de la adición de dos sustratos, siendo la adición del primer sustrato en equilibrio termodinámico. Cuando se represente $1/v$ versus $1/B$ (siendo B el segundo sustrato), el patrón se corta en el eje vertical en lugar de a la izquierda del eje.

Cleland (1970) formuló las siguientes reglas para la predicción de los patrones de velocidad inicial:

- Las pendientes de las representaciones recíprocas serán afectadas por el sustrato fijo cambiante si los puntos de combinación de él y del sustrato variable en la secuencia de reacción están conectados por etapas reversibles. Se consideran etapas irreversibles la saturación con sustratos o la eliminación de productos no presentes inicialmente. Si no existe conexión reversible, no se observa un efecto en la pendiente.

- Las ordenadas de las representaciones recíprocas serán afectadas por el sustrato fijo cambiante excepto cuando:

- a) su combinación con la enzima esté en equilibrio termodinámico,

b) el sustrato variable se combina con el complejo que contiene al sustrato fijo cambiante de tal forma que atrapa a éste último en la enzima dando lugar a que no pueda salir.

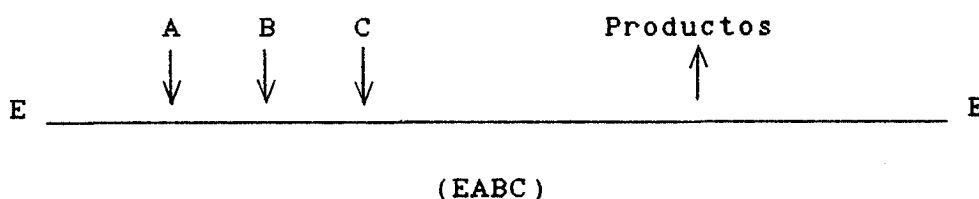
Resumiendo, se observan dos patrones básicos:

- si no hay etapas irreversibles entre los puntos de combinación de los dos sustratos, las representaciones recíprocas intersectarán a la izquierda del eje vertical,

- pero si una etapa irreversible ocurre en la secuencia de reacción entre los puntos de combinación de los dos sustratos, las representaciones serán paralelas.

En **sistemas terreactantes** la situación es más compleja, y se obtienen tres patrones de velocidad inicial dependiendo de qué par de sustratos se varíe (A-B, B-C y A-C). Con tres sustratos, sin embargo, no siempre es cierto que patrones intersectantes correspondan a mecanismos secuenciales, y paralelos a ping-pong (Cleland, 1970).

En un mecanismo **SECUENCIAL** con adición ordenada de los tres sustratos



Habrà siempre efectos de ordenadas, y si ningùn sustrato está saturante, la secuencia de reacción desde E a (EABC) es reversible, de manera que también habrá efectos de pendientes. Por tanto, los patrones de velocidad inicial serán intersectantes sin tener en cuenta si A y B, A y C ó B y C son los sustratos variable y fijo cambiante. En cada

caso, el tercer sustrato se mantendrá a una concentración constante para el patrón entero. Sin embargo, si el sustrato B está verdaderamente saturante, la secuencia reversible se rompe y el patrón de velocidad inicial A-C se hace paralelo. En la práctica, el efecto de pendientes se hace cada vez más pequeño conforme se eleva la concentración de B pero, a menos que B se eleve ≈ 100 veces su constante de Michaelis, no se verá un patrón completamente paralelo. Los patrones A-B y B-C siempre serán intersectantes sin tener en cuenta el nivel del otro sustrato. Esta aproximación la usó por primera vez Frieden (1959) para demostrar una adición ordenada de los sustratos de glutamato deshidrogenasa bovina; posteriormente otros autores (Engel y Dalziel, 1970; Silverstein y Sulebele, 1974; Rife y Cleland, 1980a) han demostrado que es un mecanismo al azar. Se debe ser cauteloso en sacar conclusiones sobre mecanismos mediante los patrones de velocidad inicial únicamente.

Mientras que un mecanismo terreactante ordenado muestra un patrón paralelo cuando el sustrato B está saturante, un mecanismo completamente al azar muestra patrones intersectantes en todos los casos. Si un sustrato (A) debe añadirse en primer lugar, pero los otros dos (B,C) pueden hacerlo al azar, se obtendrán patrones de velocidad inicial intersectantes en todos los casos, excepto cuando B o C estén saturantes. Es fácil de comprender si se recuerda que la saturación con B conduce a una adición en el orden A, B y C, mientras que la saturación con C produce que el orden sea A, C y B (esto es, la saturación en el punto de ramificación desvía todo el flujo de la reacción a través de un paso u otro) (Cleland, 1970, 1977).

En mecanismos ping-pong con tres sustratos también pueden obtenerse patrones intersectantes (Cleland, 1970).

La existencia de un mecanismo parcialmente al azar requiere la realización de más experimentos que los de

velocidad inicial sencillos para diferenciarlos entre sí (Rudolph y Fromm, 1979), ya que presenta el mismo patrón de velocidad inicial que un mecanismo ordenado u ordenado de Theorell-Chance, por lo que se deberá recurrir a los 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 la velocidad (Cleland, 1970, 1977).

2.4.2.- Estudios de inhibición por producto.

Los estudios de inhibición proporcionan numerosos datos útiles para los investigadores, y rara vez se puede deducir un mecanismo sin recurrir a ellos. A partir de los estudios con inhibidores se puede obtener información sobre las magnitudes relativas de los parámetros cinéticos que describen el sistema, el orden de unión de sustratos y liberación de productos y, a partir de las estructuras químicas de los inhibidores, la geometría del centro activo (Cleland, 1963a).

Los patrones de inhibición producidos por sustratos, productos, productos alternativos e inhibidores del tipo "dead-end" son muy útiles en la deducción del mecanismo cinético. 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 (incluido el cero), mientras que las concentraciones de los otros

sustratos se mantienen constantes a niveles no saturantes. El patrón puede cambiar si uno de los sustratos está saturante, o la inhibición puede superarse (Cleland, 1967, 1977).

Se observan tres tipos básicos de inhibición: competitiva, acompetitiva o no competitiva, dependiendo de que la pendiente, la ordenada o ambas sean una función de la concentración de inhibidor, respectivamente (Cleland, 1963b). Si la pendiente o la ordenada son función lineal de la concentración de inhibidor, la inhibición se llamará lineal, y el término de la pendiente o de la ordenada incluye un factor $(1 + I/K_i)$, donde I es la concentración de inhibidor y K_i es una constante de inhibición. Así, una inhibición competitiva lineal dará una representación de $1/v$ frente al inverso de la concentración de sustrato, a varias concentraciones de I , que formará una familia de rectas intersecantes en el eje vertical, y el sustrato se puede unir directamente a la misma forma de la enzima que el inhibidor. La inhibición acompetitiva lineal producirá una familia de rectas paralelas; el inhibidor no puede unirse a la forma de enzima que se une el sustrato, y se une a una forma que está en, o antes de, la etapa limitante de la velocidad. La inhibición no competitiva lineal da lugar a una familia de rectas que interseca en un punto a la izquierda del eje vertical por encima, por debajo o en el eje horizontal cuando, en la ecuación

$$1/v = (K/V) (1 + I/K_{is})(1/A) + (1/V) (1 + I/K_{ii})$$

el valor de K_{is} es más pequeño, más grande o igual a K_{ii} , respectivamente; en este tipo de inhibición, el inhibidor se combina en el mismo centro pero en una región diferente que el sustrato (Cleland, 1963b, 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 patrones de inhibición por producto constituye un gran conjunto de información sobre la forma de la ecuación de velocidad que puede ser utilizada para deducir el mecanismo. En la Tabla 2 se pueden apreciar algunos patrones de inhibición por producto para sistemas terreactantes.

2.4.3- Estudios de inhibición mixta por producto y dead-end.

Si un producto reacciona de modo dead-end con una forma de la enzima con la que normalmente reacciona, da inhibición mixta por producto y dead-end. Los efectos inhibidores están predichos por las Reglas 1-3 de Cleland (1963c), que son las siguientes:

1.- Un compuesto afecta la ordenada de la representación recíproca cuando se combina reversiblemente con una forma de la enzima distinta de la que se combina con el sustrato variable, y con lo cual cambia la velocidad de la reacción de manera que dicho efecto no puede ser eliminado por saturación con el sustrato variable.

2.- Un compuesto afecta la pendiente de la representación inversa cuando él y el sustrato variable se combinan con la misma forma de la enzima o están separados en la secuencia de reacción por una serie de etapas reversibles, de manera que pueden interaccionar y un cambio en la concentración del sustrato variable puede eliminarlo.

T A B L A 2

Patrones de inhibición por producto para algunos mecanismos terreactantes, suponiendo que no hay complejos dead-end ni etapas de equilibrio rápido. (Segel, 1975).

Mecanismo	Producto Inhibidor	S u s t r a t o											
		A			B			C			S a t u r a d o		
		Insaturado	Saturado con B	Saturado con C	Insaturado	Saturado con A	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	UC	MT	MT	MT
	Q	C	C	C	MT	--	MT	--	--	MT	MT	--	UC
Ordenado Bi Ter	P	MT	UC	UC	MT	MT	UC	MT	MT	UC	MT	MT	MT
	Q	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
	R	C	C	C	UC	--	UC	--	--	UC	UC	--	UC
Uni Uni Uni Bi Ping Pong Bi Ter	P	MT	--	--	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Q	UC	UC	UC	MT	MT	UC	MT	MT	UC	MT	MT	UC
	R	C	C	C	UC	--	UC	--	--	UC	UC	--	UC
Uni Bi Uni Uni Ping Pong Bi Ter	P	MT	MT	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
	Q	UC	--	--	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	R	C	C	C	MT	--	MT	--	--	MT	MT	--	MT
Bi Uni Uni Uni Ping Pong Ter Bi	P	MT	UC	--	MT	MT	--	MT	MT	--	C	C	C
	Q	C	C	C	C	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT	MT
	R	C	C	C	UC	--	UC	--	--	UC	UC	--	UC
Uni Uni Bi Uni Ping Pong Ter Bi	P	MT	--	MT	MT	C	MT	C	C	C	MT	MT	MT
	Q	C	C	C	C	--	UC	--	--	UC	UC	--	UC

C = Inhibición competitiva. UC = Inhibición acompetitiva. MT = Inhibición mixta o no competitiva.

3.- Cuando la combinación de un compuesto a dos o más puntos en la secuencia de la reacción da un efecto múltiple de ordenadas y pendientes por las reglas 1 y 2, el efecto será parabólico (o de grado mayor para más de dos puntos de combinación) si: a) los efectos producidos por todas las combinaciones son los mismos, b) los puntos de combinación están separados en la secuencia de reacción por etapas reversibles .

Sin embargo, para que los efectos parabólicos se observen, la combinación dead-end debe preceder al punto de combinación normal con etapas reversibles. La combinación en el punto normal de la secuencia da marcha atrás a la reacción y se produce un aumento en la concentración de la forma de la enzima que se combina con la forma del complejo dead-end.

En uno de los primeros estudios realizados con inhibiciones por producto para diferenciar mecanismos, Fromm y Nelson (1962) estudiaron la enzima ribitol deshidrogenasa de *Aerobacter aerogenes*, y los resultados del estudio no fueron consistentes con los patrones de inhibición sugeridos por Alberty (1958). Se encontró que los complejos inactivos, llamados abortivos, producían cambios en los patrones de inhibición observados para un mecanismo determinado.

Estos complejos abortivos ternarios son complejos dead-end del tipo enzima-sustrato-producto. En mecanismos donde ocurre una secuencia de unión ordenada, el producto en el complejo es el único que no se une normalmente a la enzima libre (Rudolph, 1979). Fromm (1961) observó un complejo enzima-NAD-piruvato con lactato deshidrogenasa mediante espectroscopía diferencial, y se han observado complejos similares en estudios de fluorescencia de emisión con NADH unido a la enzima glutamato deshidrogenasa (Winer y col., 1957). Tales complejos se han observado con numerosas enzimas, particularmente deshidrogenasas, por una variedad

de técnicas incluyendo intercambio isotópico en equilibrio (Winer y Schwert, 1958; Pantaloni e Iwatsubo, 1967; Silverstein y Sulebele, 1969, Egan y Dalziel, 1971; Cross y col., 1972; Silverstein y Sulebele, 1973).

2.4.4.- Estudios de inhibición por análogos de sustratos. Inhibición competitiva.

Un inhibidor competitivo, que generalmente es un análogo de un sustrato, cuando se une a la enzima no permitirá que ocurra formación de producto. Estos inhibidores son del tipo "dead-end" (Cleland, 1963b). Aunque los inhibidores competitivos se habían utilizado en muchos experimentos enzimáticos, su utilización como "herramienta" para hacer una elección de un mecanismo cinético entre posibles alternativas no se valoró hasta 1962, cuando Fromm y Zewe (1962) sugirieron que los inhibidores competitivos de los sustratos podían utilizarse 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 tales experimentos (Fromm, 1979). Además, tienen la ventaja de permitir llegar a conclusiones definitivas de estudios de reacciones en una sola dirección. Su limitación obvia implica la necesidad de disponer de un inhibidor competitivo para cada sustrato; sin embargo, cuando se tienen disponibles otros datos de velocidad inicial, se puede obtener información valiosa del mecanismo cinético de experimentos con un solo análogo de sustrato, incluso para sistemas Bi y Ter (Fromm, 1979).

Por definición, un inhibidor competitivo compete con el sustrato por el mismo centro en la enzima. No obstante, se obtienen resultados cinéticos idénticos si el inhibidor y el sustrato compiten por diferentes centros, sólo si la unión

es mutuamente exclusiva. Aunque generalmente hay una similitud estructural entre el sustrato y el inhibidor competitivo, éste no siempre es el caso (Fromm, 1979).

Los mecanismos cinéticos de enzimas que utilizan tres sustratos pueden dividirse, como ya se ha visto, 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 3 se pueden observar los diferentes patrones de inhibición esperados. Cuando se realizan estos experimentos es muy importante que el sustrato fijo, o no variable, se mantenga a una concentración insaturante, preferiblemente en la región de su constante de Michaelis.

El uso de inhibidores competitivos dead-end para elegir entre mecanismos al azar y ordenados ha sido empleado con muchos sistemas enzimáticos (Fromm y Zewe, 1962; Zewe y Fromm, 1965; Rudolph y Fromm, 1969; Tabatabai y Graves, 1978; Park y col., 1984; Carvajal y Kessi, 1988). El protocolo básico implica la separación de mecanismos en ping-pong o secuenciales a partir de experimentos de velocidad inicial. Después de que la naturaleza secuencial del sistema ha sido establecida, se pueden utilizar los inhibidores competitivos dead-end para determinar si el mecanismo es al azar u ordenado.

Teóricamente, usar inhibidores competitivos de sustratos para estudiar la secuencia de unión del sustrato a la enzima, es menos ambiguo que cualquiera de los experimentos de inhibición por sustrato, por producto o experimentos de intercambio isotópico. El protocolo no es más complicado que los experimentos de velocidad inicial en ausencia de inhibición.

Como la mayoría de los métodos cinéticos, el procedimiento tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, no

T A B L A 3

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 ^h
	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 ^j
	B	U	C	N ^j
	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

^a Inhibición competitiva. ^b Inhibición no competitiva. ^c Si EI reacciona con B para formar EIB, la representación sería no lineal. ^d Inhibición acompetitiva. ^e Si 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. ^g Si EIB reacciona con C para formar EIBC, la representación sería no competitiva. ^h Si EIA reacciona con C para formar EIA, la representación sería no competitiva. ⁱ Si EI reacciona con B para formar EIB, la representación sería no lineal. ^j Si FI reacciona con C para formar FIC, la representación sería no lineal.

permitirá diferenciar entre mecanismos iso y convencionales, ni puede utilizarse para elegir entre mecanismos de Theorell-Chance y otros análogos que impliquen complejos centrales de vida larga (Fromm, 1979).

2.4.5.- Ejemplos de enzimas con distintos tipos de mecanismos.

a) MECANISMOS TOTALMENTE AL AZAR:

* NAD-ICDH de levadura de panadería (Cennamo y col., 1967).

* Adenilosuccinato sintetasa de *E.coli* (Rudolph y Fromm, 1969), en equilibrio rápido.

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

* Glutamina sintetasa de *E.coli* (Wedler y Boyer, 1972).

* NADP-ICDH de corazón de cerdo (Northrop y Cleland, 1974; Uhr y col., 1974).

* NAD-málica de *Ascaris suum* (Kiick y col., 1984; Park y col., 1984), con formación de dos complejos dead-end: E-malato y E-NAD-malato.

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

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

b) MECANISMOS PARCIALMENTE AL AZAR DEL TIPO BC:

* Succinil CoA sintetasa de *E.coli* (Moffet y Bridger, 1970, 1973).

* Arginil-tRNA ligasa de *Neurospora* (Nazario y Evans, 1974), con liberación ordenada de sus productos.

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

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

c) MECANISMOS PING-PONG:

* Piruvato carboxilasa de hígado de pollo (Barden y col., 1972), del tipo Bi Bi Uni Uni, con la formación de dos complejos abortivos E-bicarbonato-P y E-bicarbonato-MgADP, y mostrando también que la unión de los dos primeros sustratos fue al azar, lo mismo que la liberación de los dos primeros productos.

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

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

* NADH-peroxidasa de *Streptococcus faecalis* (Stoll y Blanchard, 1988).

d) MECANISMOS ORDENADOS:

* Enzima málica de hígado de paloma (Hsu y col., 1967; Schimerlik y Cleland, 1977), con un complejo abortivo E-bicarbonato.

* NAD-gliceraldehido 3-P deshidrogenasa de músculo de conejo (Orsi y Cleland, 1972).

* NADP-ICDH de *Rhodopseudomonas spheroides* (Buzdygon y col., 1973).

* Aspartato transcarbamilasa de *Streptococcus faecalis* (Chang y Jones, 1974), con dos complejos dead-end: E-carbamil fosfato-carbamil aspartato y E-fosfato-aspartato.

* Gliceroquinasa de *Candida mycoderma* (Janson y Cleland, 1974).

* Glutamina sintetasa de *E.coli* (Meek y Villafranca, 1980).

* L-alanina deshidrogenasa de *B.subtilis* (Grimshaw y Cleland, 1981).

* Isocitrato deshidrogenasa de *E.coli* (Nimmo, 1986).

* Fosfofructoquinasa de *Ascaris suum* (Rao y col., 1987), con liberación al azar en equilibrio rápido de los productos.

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

* NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* (Bonete y col., 1989), con la formación de un complejo abortivo E-2-oxoglutarato.

2.5. MECANISMO CINÉTICO DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

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 GDH implicaba un orden obligatorio de unión de sustratos con la enzima, siendo el complejo E-coenzima el primero que se formaba. Esta proposición se basó en las observaciones de Frieden (1959) de que la enzima libre se unía a NADPH y que la incubación de la enzima con amonio y 2-oxoglutarato en H_2O^{18} no producía un intercambio del O^{18} en el grupo ceto del 2-oxoglutarato.

Estudios posteriores, empleando métodos más sensibles, indicaron que este modelo era incorrecto. Engel y Dalziel (1969), estudiando la desaminación oxidativa de L-glutamato y norvalina, propusieron que sus datos podían excluir ciertos mecanismos de orden obligatorio, aunque no indicaban inequívocamente una unión al azar. Más tarde, los estudios de velocidad inicial de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato (Engel y Dalziel, 1970) mostraron ser inconsistentes con cualquiera de los posibles mecanismos que implican un orden obligatorio y se llegó a la conclusión de que el mecanismo debía implicar, por lo menos, una unión al azar de los tres sustratos con interconversión de los complejos centrales como etapa limitante de la velocidad. Cuando este mecanismo se propuso originalmente la evidencia disponible (Fisher, 1960) de los estudios realizados sobre la unión de sustratos no lo respaldaron. Posteriormente, estudios de la protección de la enzima por sus sustratos frente a la inactivación (Malcoln y Radda, 1970; Chen y Engel, 1974, 1975) y estudios espectrofotométricos de la unión de sustratos (Cross y col., 1972; Prough y col., 1972) evidenciaron la existencia de algunos complejos ternarios y

binarios que se necesitaban para un mecanismo al azar (Engel y Chen, 1975).

Un estudio de velocidades de intercambio de los pares L-glutamato - 2-oxoglutarato, NAD^+ - NADH y NADP^+ - NADPH apoyaron el concepto de mecanismo parcialmente al azar, o bien otra posibilidad, una unión ordenada de sustratos y coenzimas (Silverstein y Sulebele, 1973). Los sustratos y coenzimas fueron capaces de unirse en cualquier orden, pero se disociaron más libremente de complejos binarios que de ternarios (Engel y Dalziel, 1970; Colen y col., 1972). Sin embargo, el mecanismo no podía ser totalmente al azar, ya que las velocidades de intercambio para diversos pares de coenzima y sustratos no fueron idénticas (Engel y Dalziel, 1970).

Los complejos binarios enzima- NADP^+ o enzima-L-glutamato son importantes cinéticamente y las etapas posteriores formadas por ambos complejos se equilibran rápidamente (Colen y col., 1972). La interacción entre coenzima y sustrato conduce a la formación de un complejo ternario E- NADP^+ -L-glutamato. A una conclusión similar llegaron Fisher y McGregor (1960) y Engel y Dalziel (1969, 1970), basándose en la formación del complejo abortivo E-NAD(P)H-L-glutamato durante la reacción catalítica, de donde NAD(P)H se disocia más lentamente que del complejo normal E-NAD(P)H. Esta evidencia se confirmó con el efecto del L-glutamato en la fluorescencia del complejo E-NADH (Engel y Dalziel, 1969; Cross y col., 1972).

Di Franco e Iwatsubo (1971) observaron que dos complejos distintos E-NADPH aparecían durante la oxidación de L-glutamato, uno débilmente y el otro fuertemente fluorescente: el primero se identificó como E- NADP^+ -KG. Después de la liberación del 2-oxoglutarato se formó el segundo, un complejo ternario abortivo E-NADPH-L-glutamato, en presencia de niveles elevados de sustratos, seguido por

la disociación a enzima libre, NADPH y L-glutamato. El primer complejo presentó un máximo de absorbancia a 330 nm debido a nicotinamida, desplazado al azul, pero no mostrado por E-NADPH-L-glutamato, E-NADPH o E-NADPH-NH₄⁺; el segundo complejo, en cambio, presentó un espectro desplazado al rojo, característico de E-NADPH o E-NADPH-L-glutamato.

En la Tabla 4 se muestran glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes con el tipo de mecanismo cinético propuesto para cada una de ellas. Como se puede observar, existe bastante controversia en cuanto al mecanismo cinético que sigue esta enzima. La GDH de hígado bovino (Fisher, 1960) y la NAD-GDH de hígado de rana (Fahien y col., 1965) mostraron un mecanismo ordenado de adición de sustratos: NADH en primer lugar, seguido por amonio y por último 2-oxoglutarato, igual que la enzima de hígado de pintarroja (Corman y col., 1967). La NAD-GDH de *T.novellus* (LéJohn y col., 1968), en ausencia de AMP (activador), presentó un mecanismo alostérico, mientras que en presencia de AMP el mecanismo fue ordenado, siendo el orden de adición de los sustratos en la desaminación: NAD⁺ y L-glutamato, y liberándose los productos en el siguiente orden: amonio, 2-oxoglutarato y NADH; igual que la NAD-GDH de *B.emersonii* (LéJohn y col., 1969), y en cambio, la NADP-GDH de *T.novellus* (LéJohn y col., 1968) mostró el mismo mecanismo de adición de sustratos, pero la liberación de productos fue: 2-oxoglutarato, amonio y NADPH. Para la enzima de hígado bovino (Fahien y Strmecki, 1969b) los estudios de velocidad inicial fueron consistentes con un mecanismo ordenado (ter - bi) de adición de sustratos, con NADH en primer lugar, seguido de 2-oxoglutarato y amonio si el tampón empleado era arseniato, y en cambio el orden seguido fue NADPH, amonio y 2-oxoglutarato si se utilizaba tampón Tris-acetato.

TABLA 4

Tipos de mecanismos propuestos para glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes.

FUENTE	ESPECIFICIDAD DE 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)
Hígado pintarroja	NADP	Ordenado	Corman y col. (1967)
<i>T. novellus</i>	NADP	Ordenado	LéJohn y col. (1968)
	NAD	Ordenado (con AMP)	LéJohn y col. (1968)
Hígado bovino	NAD/NADP	Ordenado	Fahien y Strmecki (1969b)
<i>B. emersonii</i>	NAD	Ordenado	LéJohn y col. (1969)
Hígado bovino	NAD/NADP	Al azar	Engel y Dalziel (1969, 1970)
<i>B. flavum</i>	NADP	Ordenado	Shilo y Ozaki (1970)
<i>Clostridium SB4</i>	NAD	Parcial al azar BC	Winnacker y Barker (1970)
Hígado bovino	NAD/NADP	Azar (desamin.) y ordenado (aminac.)	Colen y col. (1972)
<i>S. typhimurium</i>	NADP	Ordenado	Coulton y Kapoor (1973b)
Hígado bovino	NAD/NADP	Ordenado	Silverstein 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 (desamin.) y ordenado (aminac.)	Rife y Cleland (1980a)

Los resultados de análisis cinético obtenidos con NADP-GDH de *B.flavum* (Shiio y Ozaki, 1970) mostraron un mecanismo ordenado en el que NADPH, 2-oxoglutarato y amonio se combinaron con la enzima en este orden. El mecanismo catalítico de GDH de hígado bovino sugerido mediante los experimentos realizados por Silverstein y Sulebele (1973) puede ser denominado de adición de sustratos en un orden alternativo, en el cual dichos sustratos pueden unirse y disociarse en cualquier orden. Esta conclusión es compatible con los resultados de los estudios cinéticos obtenidos por Engel y Dalziel (1970) y con la evidencia obtenida por espectroscopía diferencial ultravioleta para los complejos binarios de GDH con 2-oxoglutarato (Cross y col., 1972) y L-glutamato (Prough y col., 1972), así como con un estudio cinético sugiriendo una unión al azar de NADP⁺ y L-glutamato (Colen y col., 1972).

En la reacción de aminación catalizada por NAD-GDH de *Clostridium SB₄* (Winnacker y Barker, 1970) 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. De acuerdo con Cleland (1963a,c) esta distribución de representaciones indica un mecanismo secuencial en donde el segundo y tercer sustratos se combinan al azar con el complejo E-NADH. Ya que 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 a la enzima seguido por 2-oxoglutarato y amonio al azar. En *S.typhimurium* (Coulton y Kapoor, 1973b) la NADP-GDH presentó un mecanismo ordenado con la unión de NADPH, amonio y 2-oxoglutarato en este orden, y la liberación de L-glutamato seguida de NADP⁺. Este mismo orden se había obtenido anteriormente para la

enzima de hígado bovino (Frieden, 1959). Esta enzima bovina llevó a considerar a Engel y Chen (1975) un mecanismo secuencial al azar en el orden de adición de los tres sustratos de la aminación, con interconversión de los complejos centrales como etapa limitante de la velocidad.

Kun y Achmatowicz (1965) determinaron las propiedades catalíticas de GDH de hígado bovino en presencia de varios análogos sintéticos de sustratos. El fluoroglutarato fue inhibidor puramente competitivo para glutamato, pero no competitivo con respecto a 2-oxoglutarato. Algunos aminoácidos monocarboxílicos (por ejemplo, leucina) (Struck y Sizer, 1960) se sabe que son sustratos de la GDH bovina a pHs por encima de 8.0, mientras que a pHs más bajos sólo activan la oxidación de L-glutamato (Yielding y Tomkins, 1961). Un modelo sencillo del centro activo de la enzima requeriría sólo un subcentro de unión para la configuración del α -aminoácido de ambos aminoácidos mono- y dicarboxílicos y predeciría una inhibición competitiva mejor que una activación (Markau y Steinhübel, 1972). Por otro lado, hidroxilamina fue acompetitiva con el 2-oxoglutarato cuando se empleó NADPH como coenzima y no competitiva cuando se utilizó NADH. Rife y Cleland (1980a) utilizaron norvalina y α -cetovalerato como sustratos alternativos para investigar el mecanismo cinético de GDH bovina, y a partir de estudios de velocidad inicial y de inhibición dead-end con oxalilglicina sugirieron que a la enzima se unía NADPH, 2-oxoglutarato y amonio en ese orden, liberándose al azar NADP⁺ y L-glutamato.

Los análogos de NAD⁺: 3-acetilpiridina y 3-aldehído piridina (Smith y col., 1975) se utilizaron con mayor eficacia que la coenzima natural. Olson y Anfinsen (1953) mostraron que el NAD⁺ se empleaba más eficazmente que el NADP⁺. La GDH bovina está compuesta de seis subunidades (Bell y Dalziel, 1973; Alex y Bell, 1980), en cada una de las cuales hay dos centros capaces de unirse a NADH: el

centro activo y un segundo centro regulador (Jallon e Iwatsubo, 1971). Al centro activo puede unirse NADH y NADPH con igual facilidad (George y Bell, 1980) pero el centro regulador tiene una afinidad mucho mayor para NADH que para NADPH. La presencia de un cosustrato tal como L-glutamato aumenta considerablemente la afinidad de NAD(P)H al centro activo, pero parece no tener efecto en la afinidad del centro regulador (Banerjee y col., 1987). Las coenzimas oxidadas NAD^+ y NADP^+ se unen mucho más débilmente que las coenzimas reducidas en ausencia de un cosustrato y mientras que parece haber dos centros de unión para NAD^+ (Bayley y O'Neill, 1980; Smith y Bell, 1982), el número de centros en el complejo binario E- NAD^+ aún no está claro (Banerjee y col., 1987).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. MATERIALES.

3.1.1.- Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en la realización del presente Trabajo fueron de grado analítico, mientras no se especifique lo contrario, y se usaron directamente, sin ningún tipo de purificación previa.

- **Medio de cultivo:** Las sales fueron suministradas por la firma PANREAC; el extracto de levadura y el bacto-agar por la casa DIFCO y la silicona antiespumante por la firma MERCK.

- **Soportes cromatográficos:** Los geles Sepharosa-4B, Sephadex G-100 y Sepharosa CL-6B fueron obtenidos de la firma PHARMACIA FINE CHEMICALS, mientras que DEAE-celulosa fue de SIGMA CHEMICAL Co. e hidroxapatito preparado según el método de Levin (1962).

- **Determinación de proteínas:** La albúmina de suero bovino (fracción v) fue de la casa SIGMA CHEMICAL Co. y el reactivo Folin-Ciocalteu, de MERCK.

- **Electroforesis:** Acrilamida, bisacrilamida y persulfato amónico de la firma BIO-RAD; riboflavina, TEMED, azul de bromofenol y azul Coomassie R-250, de MERCK.

- **Determinación de la actividad enzimática:** Las coenzimas NADH, NAD⁺, NADP⁺ y NADPH fueron de la casa BOEHRINGER, MANNHEIM GERMANY, así como el 2-oxoglutarato sódico.

L-glutamato y glutarato fueron de SIGMA CHEMICAL Co., y acetato sódico e hidroxilamina de MERCK.

- **Nucleótidos, aminoácidos y otros efectores:** Todos los nucleótidos utilizados fueron suministrados por BOEHRINGER, MANNHEIM GERMANY; los aminoácidos, de MERCK, salvo L-alanina y L-valina, que fueron de SIGMA; oxalacetato, D-malato y PEP de SIGMA, citrato y piruvato de la firma Merck.

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

3.1.2.- Material biológico.

El Dr. D. Francisco Rodríguez-Valera, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alicante cedió, para la realización del presente Trabajo, un mutante incoloro de *Halobacterium halobium* NRC 36014.

3.2. METODOS.

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 del mar artificial (Subov, 1931), excepto para NaHCO_3 y CaCl_2 , que conservan la concentración normal del agua del mar (Rodríguez-Valera y col., 1980). La composición del agua de sales, con una concentración del 25% en contenido de sales (porcentaje p/v) fue la siguiente: NaCl 19.5; MgCl_2 1.62; MgSO_4 2.01; CaCl_2 0.092; KCl 0.5; NaHCO_3 0.017 y NaBr 0.058. Partiendo de esta disolución se preparó el medio de cultivo, que estaba compuesto por el agua de sales descrita y 0.5% de extracto de levadura; se agitó magnéticamente y se ajustó el pH entre 7.0 y 7.4 con KOH 1N. Este medio de cultivo se colocó en botellas de 3 litros y se sometió a un proceso de esterilización a 121°C en un autoclave P Selecta, Autester, modelo 437-G, durante 20 minutos.

3.2.2.- Mantenimiento de la cepa.

Hasta el momento de su utilización, la cepa mutante de *Halobacterium halobium* (36014) se conservó en tubos mantenidos en la oscuridad, a temperatura ambiente y en un medio sólido que contenía agua de sales al 25%, 0.5% de extracto de levadura y 2% de bacto-agar, a un pH de 7.3.

3.2.3.- Obtención del inóculo.

Se tomaron las células del cultivo en medio sólido con un asa de platino en condiciones estériles y se sembraron en un tubo de 5ml del mismo medio de cultivo líquido (dos tubos por cada 3l. de medio de cultivo). Se colocaron en posición horizontal en una estufa P Selecta, donde permanecieron a 37°C durante 4 días aproximadamente, hasta que se detectó la aparición de una turbidez característica, lo que indicó un buen crecimiento.

3.2.4.- Siembra del inóculo.

El contenido de los tubos de 5ml con el inóculo se pasó a unos frascos de 3l. conteniendo el medio de cultivo y se mantuvieron en un baño termostatzado a 37°C, para continuar el crecimiento, con aireación mediante flujo de aire humidificado y con agitación magnética. Al cultivo se le adicionó silicona antiespumante al 0.01% para evitar la formación de espuma en la superficie del cultivo.

3.2.5.- Extracto bacteriano.

El crecimiento de las células se continuó hasta que la función crecimiento = $f(\text{tiempo})$ alcanzó su fase exponencial, medida en un espectrofotómetro Spectronic 2000 de la casa

BAUSCH & LOMB, a 680nm. Las células se cosecharon en una centrifuga refrigerada BECKMAN J2-21, con rotor de ángulo fijo tipo JA-14, a 9600xg durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se recogieron, lavándose con agua de sales al 25% varias veces.

3.2.6.- Homogeneización con ultrasonidos.

El siguiente paso del proceso fue la obtención del peso húmedo de las células y su posterior resuspensión en tampón fosfato 0.05M de pH 6.6 conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5M, obteniéndose una concentración final de células húmedas de 100g por litro de tampón, que a continuación se disgregaron en un homogeneizador de vidrio tipo Potter. Las células se terminaron de romper en un sonicador Branson Sonifier, modelo B-12, con sonda de titanio de 12.7mm de diámetro y de 150w de potencia, por periodos de 5 minutos, varias veces, con intervalos de reposo para restablecer el equilibrio térmico. Se consideró terminada la rotura cuando se observó un aspecto gelatinoso y de color oscuro en el medio.

3.2.7.- Obtención del extracto crudo.

La suspensión sonicada se centrifugó en una ultracentrifuga Beckman, modelo L5-65B, con rotor de ángulo fijo tipo 35, durante una hora, a 105000xg. El sobrenadante obtenido sirvió como fuente de glutamato deshidrogenasa (GDH).

3.2.8.- Determinación cuantitativa de proteína.

Se llevó a cabo utilizando una modificación del método de Lowry propuesta por Hartree (1972). Un análisis estándar se efectuó mediante el siguiente esquema: se tomó 1ml de disolución protéica que contuviera entre 15 y 150 μg aproximadamente, lo cual se consiguió con una dilución apropiada de la disolución original. Se le adicionaron 0.9ml de disolución A y se incubaron las muestras a 50°C durante 10 minutos; se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 0.1ml de disolución B, agitando y dejando que transcurriera la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos; seguidamente se añadieron 3ml de disolución C preparada recientemente, agitando rápidamente e incubándose la mezcla a 50°C durante 10 minutos más; se enfrió la disolución una vez finalizado el tratamiento y a continuación se registró la absorbancia a 650nm frente a un blanco exento de proteína, en un espectrofotómetro HITACHI modelo 100-80.

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 por mínimos cuadrados.

Las disoluciones empleadas se prepararon de la siguiente forma:

Disolución A: 2g de tartrato sódico potásico y 100g de carbonato sódico anhidro, disueltos en 500ml de NaOH 1N y llevados a 1 litro con agua destilada.

Disolución B: 2g de tartrato sódico potásico y 1g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 90ml de agua destilada y 10ml de NaOH 1N.

Disolución C: 1 volumen de reactivo Folin-Ciocalteau (Merck) por cada 15 volúmenes de agua destilada. Esta disolución se preparó en el momento de usarse.

3.2.9.- Determinación de actividades enzimáticas.

3.2.9.1.- Medida de actividad de glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente.

Se midió la actividad en el sentido de aminación reductiva (síntesis de glutamato) en un volumen total de 2ml, con tampón glicina-NaOH 80mM de pH 9.4, conteniendo NaCl 3.2M y AEDT 2.6mM, acetato amónico 105mM, NADH 0.3mM y 2-oxoglutarato 20mM, y manteniendo la temperatura a 40°C con un baño termostático de circulación de agua, mientras no se especifique lo contrario. La oxidación del NADH se siguió a 340nm con un espectrofotómetro Spectronic 2000 de la casa BAUSCH & LOMB, equipado con un programa para la determinación de cinéticas enzimáticas. (La absortividad molar del NADH es de $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).

En el sentido de desaminación oxidativa (oxidación de L-glutamato) también se midió la actividad en un volumen total de 2ml, con tampón glicina-NaOH 80mM de pH 9.0 conteniendo NaCl 0.9M, AEDT 2.6mM, L-glutamato 50mM y NAD^+ 3mM, también a 40°C.

Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato por minuto a las condiciones del ensayo.

3.2.9.2.- Medida de actividad de glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente.

Se midió la actividad en el sentido de aminación reductiva en 2ml de tampón TRIS-HCl 0.1M de pH 8.5, conteniendo NaCl 4M, AEDT 3.25mM, acetato amónico 80mM, NADPH 0.17mM y 2-oxoglutarato 30mM, y manteniendo la temperatura a 40°C con un baño termostático de circulación de agua, mientras no se especifique lo contrario.

La oxidación del NADPH se siguió a 340nm con un espectrofotómetro Spectronic 2000 de la casa BAUSCH & LOMB, equipado con un programa para la determinación de cinéticas enzimáticas. (La absorptividad molar del NADPH también vale $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, como el NADH).

3.2.10.- Purificación de glutamato deshidrogenasas.

3.2.10.1.- Cromatografía en Sepharosa-4B.

El procedimiento utilizado fue una modificación del método de Mevarech y col. (1976), realizada en este Departamento de Bioquímica. En una columna Pharmacia (2.6x28cm) se empaquetaron 150ml de Sepharosa-4B con gran cantidad de agua destilada para eliminar la azida sódica que lleva como agente antimicrobiano, y después se estabilizó el gel en tampón fosfato sódico 0.05M de pH 6.6 conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5M.

La cromatografía del extracto sonificado se desarrolló con la ayuda de una bomba peristáltica LKB Microperpex a una velocidad de flujo de 48ml/h. Cuando se introdujo todo el extracto ($v \approx 150\text{ml}$), se lavó la columna con el tampón citado anteriormente, y a continuación se eluyeron las enzimas aplicando un gradiente lineal desde 2.5 a 0.5M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tampón fosfato 0.05M de pH 6.6, recogiendo fracciones de 16ml con la ayuda de un colector LKB Redirac, a temperatura ambiente.

A continuación se midió la absorbancia a 280nm, así como las actividades de glutamato deshidrogenasa y la concentración de proteína de las fracciones recogidas, uniéndose las que tenían mayores actividades específicas.

3.2.10.2.- Cromatografía en DEAE-celulosa.

Se pesaron 2.5g de DEAE-celulosa y se suspendieron en HCl 0.5M. Después de media hora se empaquetó una columna de 3cm de diámetro interno, se lavó con agua destilada hasta pH neutro, eliminándose las partículas más pequeñas con una pipeta Pasteur. Se añadió NaOH 0.5M y después de media hora, se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Seguidamente, el tampón fosfato 0.05M de pH 6.6 conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5M sirvió para equilibrar el gel.

Las fracciones obtenidas en la etapa anterior se introdujeron en la columna con la ayuda de una bomba peristáltica GILSON, a una velocidad de flujo de 36ml/h y se lavó con el mismo tampón anterior. La elución de la enzima GDH se realizó con tampón fosfato 0.05M pH 7.3 conteniendo NaCl 4M, recogiendo fracciones de 3ml y determinando la concentración de proteína y la actividad enzimática, además de la absorbancia a 280nm, reuniendo las fracciones activas.

3.2.10.3.- Cromatografía de tamizado molecular en Sepharosa-4B.

En una columna (2.6x29cm) de la firma Pharmacia se empaquetaron 154ml de Sepharosa-4B, lavándose con tampón fosfato 0.05M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M hasta equilibrar el gel.

La cromatografía de las fracciones reunidas en la etapa anterior tuvo lugar con la ayuda de una bomba peristáltica GILSON a una velocidad de flujo de 30ml/h, eluyéndose la enzima con el mismo tampón fosfato de pH 7.3.

Como en todas las etapas anteriores, se midió la absorbancia a 280nm, la cantidad de proteína y la actividad enzimática, reuniendo las de mayor valor de actividad específica.

3.2.10.4.- Cromatografía en Sephadex G-100.

Se pesaron, aproximadamente, 10g de Sephadex G-100 y se hincharon con agua destilada durante 5 horas en un baño con agua hirviendo. Alcanzada la temperatura ambiente se empaquetó en una columna (2.6x37.5cm) de la firma Pharmacia equilibrándose con tampón fosfato 0.05M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M.

Se introdujeron las fracciones recogidas anteriormente a una velocidad de flujo de 35ml/h, suministrada por una bomba peristáltica GILSON, y se eluyó la enzima con el mismo tampón del equilibrio, recogiendo fracciones de 3ml.

Posteriormente se midió la absorbancia a 280nm y se determinó la actividad específica de todas las fracciones recogidas, reuniéndose las más activas.

3.2.10.5.- Cromatografía en hidroxiapatito.

Las fracciones más activas reunidas en el paso anterior se introdujeron en una columna (1.5x7.5cm) de hidroxiapatito equilibrada con tampón fosfato sódico 0.05M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Se lavó la columna con el mismo tampón y a continuación se aplicó un gradiente discontinuo de tampones fosfato sódico cuyas concentraciones fueron 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25M, de pH 7.3, todos ellos conteniendo NaCl 4M.

Como en los casos anteriores, se midió la absorbancia a 280nm, la cantidad de proteína y la actividad enzimática, reuniéndose las fracciones más activas y sirviendo como fuente de posteriores estudios.

3.2.11.- Criterio de pureza.

Para determinar el grado de purificación de las 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).

Se utilizó, para la realización de las mismas, un equipo de electroforesis analítica de la casa Buchler Instruments Co.

Teniendo en cuenta los pesos moleculares de ambas enzimas se utilizaron geles de poliacrilamida del 7.5 al 12.5%, relación que produce un grado de reticulación adecuado para la resolución de proteínas con dicho rango de peso molecular.

En la Tabla 5 se muestran las disoluciones necesarias y las proporciones en que deben mezclarse, para la formación y desarrollo de los geles, según Hames (1981). Para ello, el gel separador, de 8cm de longitud, se obtuvo por polimerización de acrilamida en presencia de persulfato amónico como catalizador, mediante los reactivos adecuados, con la ayuda de una pipeta Pasteur. Después se añadieron unas gotas de agua destilada sobre la disolución de los geles para que al polimerizar quedara una superficie horizontal en el gel y seguidamente, se sometieron a una radiación fluorescente para producir la polimerización durante 30 minutos. A continuación se polimerizó una capa de 1 cm de longitud de gel espaciador por el mismo método. Se montaron los tubos que contenían los geles polimerizados en la cubeta de desarrollo, añadiendo el tampón de recorrido en las cubetas inferior y superior.

Las muestras para la electroforesis se prepararon de la siguiente forma: a 0.9ml de disolución de proteína se añadió 0.1ml de SDS al 20% y 0.045ml de 2-mercaptoetanol, y se calentó durante 5 minutos en agua hirviendo. Se dejaron enfriar. Las muestras se llevaron al 10% en sacarosa para aumentar su densidad, y azul de bromofenol como indicador, hasta una concentración final del 0.002%. Las muestras así desnaturalizadas se resolvieron en un medio constituido por tampón TRIS-glicina-SDS de pH 8.6, aplicando una intensidad de corriente de 3mA por tubo hasta que se terminó la electroforesis (aproximadamente, 4 horas).

TABLA 5

Reactivos, disoluciones y cantidad en que se mezclaron, para la realización de la electroforesis en geles al 7.5% y al 12.5%, en presencia de SDS (Hames, 1981).

DISOLUCION	GEL SEPARADOR (inferior) (ml)		GEL ESPACIADOR (superior) (ml)
	7.5%	12.5%	
Acrilamida-bisacrilamida	7.5	12.5	2.5
Tampón gel separador	3.75	3.75	---
Tampón gel espaciador	---	---	5.0
SDS	0.3	0.3	0.2
Persulfato amónico	1.5	1.5	1.0
ó	ó	ó	ó
Riboflavina	---	---	2.5
Agua	16.95	11.95	11.3 ó 9.8
TEMED	0.015	0.015	0.015

Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) = 30g acrilamida, 0.8g bisacrilamida y agua destilada hasta 100ml.

Tampón gel separador: 0.375M Tris-HCl, pH 8.8 = 36.3g Tris y 48ml HCl 1M, llevados a 100ml con agua destilada.

Tampón gel espaciador: 0.125M Tris-HCl, pH 6.8 = 6g Tris disueltos en 40ml de agua; se llevan a pH 6.8 con HCl 1M (≈48ml) y se añade agua hasta un volumen final de 100ml.

Persulfato amónico (1.5%, p/v) = 15mg / ml de agua destilada.

Riboflavina (0.004%, p/v) = 4mg / 100ml de agua destilada.

Tampón de recorrido: 0.025M Tris, 0.192M glicina, pH 8.3 = 30.3g Tris, 144.0g glicina y 10.0g SDS, disueltos y llevados a 1l con agua destilada.

Los geles se fijaron y tiñeron sumergiéndolos durante un mínimo de 4 horas y un máximo de 12 horas en una disolución de Azul Coomassie R-250 (1.25g en una mezcla de 227ml de metanol, 46ml de ácido acético glacial y agua hasta 500ml). La destinción se realizó por sucesivos lavados en disolución de metanol - ácido acético - agua, en las proporciones relativas de 100-7-93 (en volumen) e incubando los geles en un baño a 40°C. Los geles, una vez desteñidos, se conservaron en una disolución de ácido acético glacial al 7.5%.

3.2.12.- Determinación del peso molecular aparente.

La aplicación de la cromatografía de tamizado molecular permitió calcular el peso molecular aparente de las dos enzimas glutamato deshidrogenasas.

Se utilizó una columna de Sepharosa CL-6B (2.6x32cm) equilibrada con tampón fosfato sódico 0.05M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Se utilizó el método cromatográfico en columna de Louis y col. (1971) para las determinaciones de los pesos moleculares a elevadas concentraciones salinas. Para calibrar la columna se emplearon las siguientes proteínas: ferritina (450000 daltons), catalasa (240000 daltons), albúmina de huevo (45000 daltons), albúmina de suero bovino (66000 daltons) y β -lactoglobulina (18400 daltons-subunidad y 36800 daltons nativa). El volumen muerto de la columna (v_0) se determinó con azul dextrano y el volumen interno (v_1) con cromato potásico. Estos dos compuestos y las proteínas anteriores se eluyeron de la columna a temperatura ambiente. A continuación se introdujeron 5ml de la NAD-GDH y se eluyeron con el mismo tampón citado

anteriormente; luego se hizo lo mismo para la NADP-GDH. Estas fueron identificadas ensayando su actividad enzimática, mientras que en las proteínas estándar se hizo midiendo la absorbancia a 280nm. Se determinaron los valores de K_{av} para cada una de las proteínas, obteniéndose una recta de calibrado que, ajustada por mínimos cuadrados, respondió a la ecuación:

$$K_{av} = 2.702 - 0.413 \times \log P_m \quad (r = 0.995)$$

donde K_{av} es el cociente $(v_e - v_0)/(v_t - v_0)$, siendo v_e el volumen de elución de cada proteína y v_t el volumen total, mientras que P_m representa el peso molecular de cada una de las proteínas.

El peso molecular aparente de las dos glutamato deshidrogenasas se interpoló en la citada recta.

3.2.13.- Medida de fluorescencia de GDHs.

Los cambios en la fluorescencia intrínseca de las enzimas GDH de *H. halobium* se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorofotómetro SHIMADZU, RF-540. Se realizaron espectros con una disolución de triptófano y otra de tirosina, ambas a $10^{-4}M$, disueltas en tampón fosfato 0.1M pH 7.3 con NaCl 4M, para obtener la longitud de onda de emisión en esas condiciones; las longitudes de onda de excitación fueron 295nm (Fig.4) y 275nm (Fig.5). Los espectros se realizaron con una anchura de rendija de 5nm para la excitación, y de 10nm para la emisión, así se consiguió una mejor resolución. Estos espectros se compararon con otro que

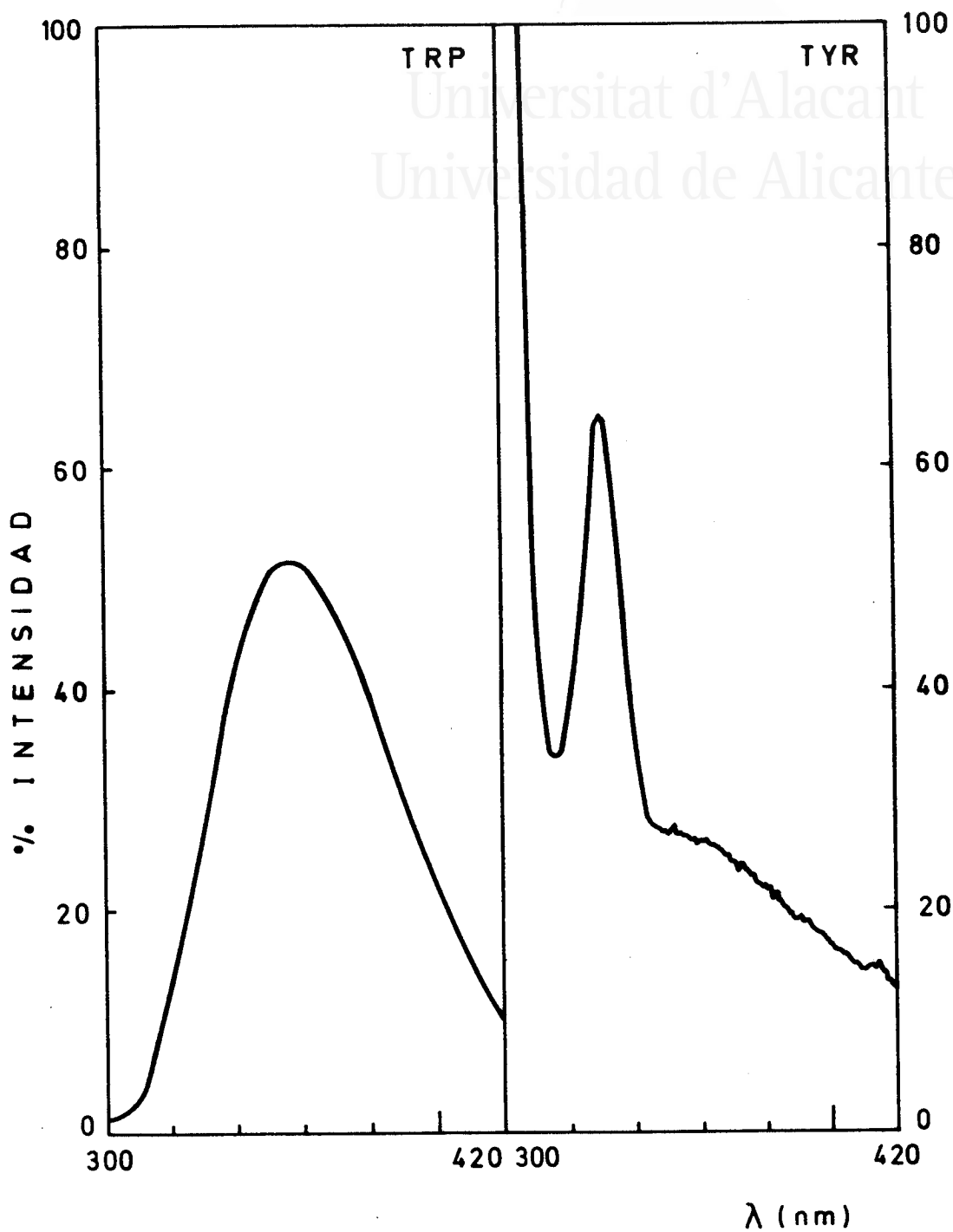


Figura 4 : Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano y tirosina, ambos a una concentración 10^{-4} M, en tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Longitud de onda de excitación: 295nm. Rango de emisión: 300 nm - 420 nm.

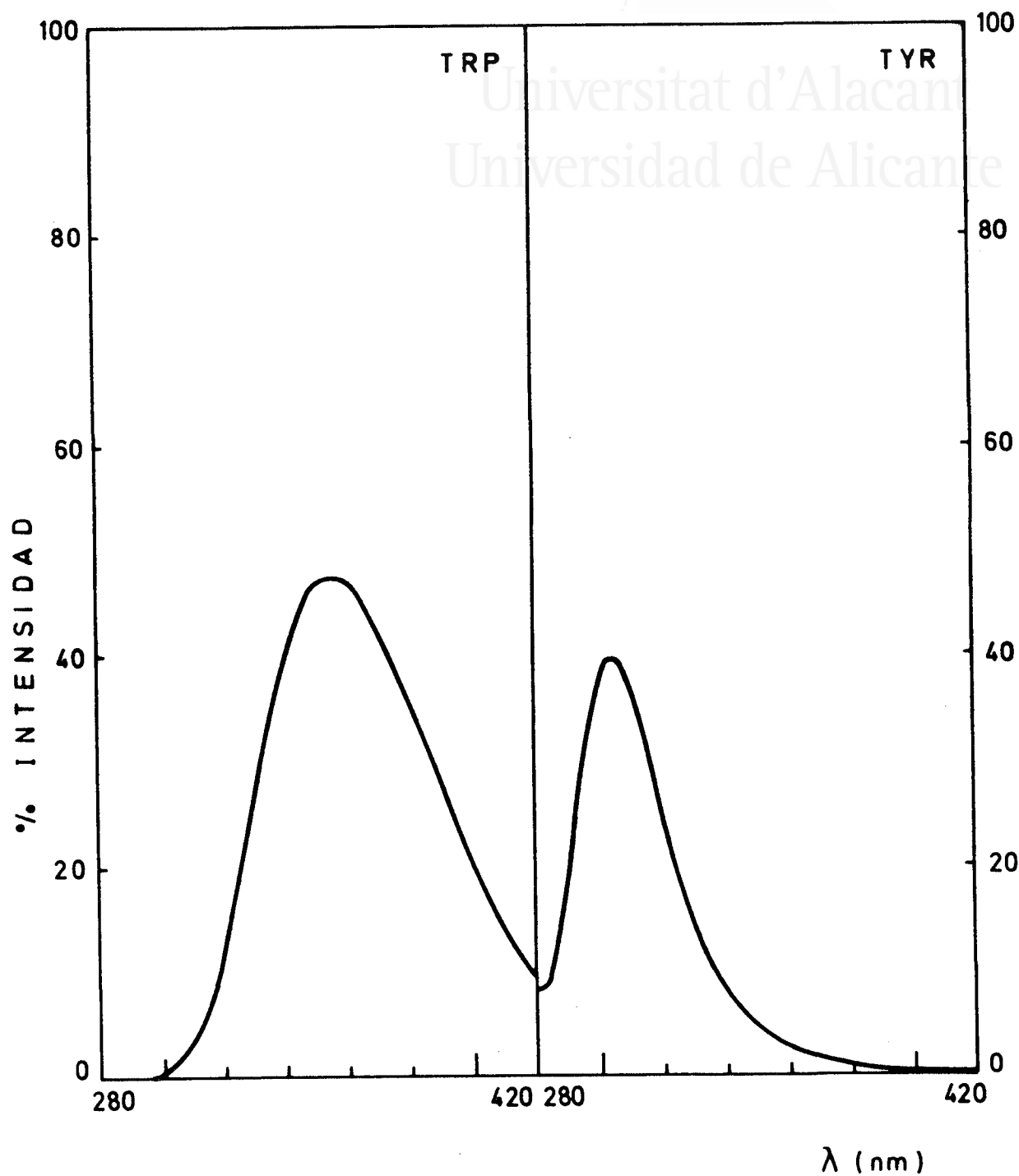


Figura 5 : Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano y tirosina, ambos a una concentración 10^{-4} M, en tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Longitud de onda de excitación: 275 nm. Rango de emisión: 280 nm - 420 nm.

se obtuvo con la mezcla de las dos disoluciones anteriores en la misma proporción. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.6.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

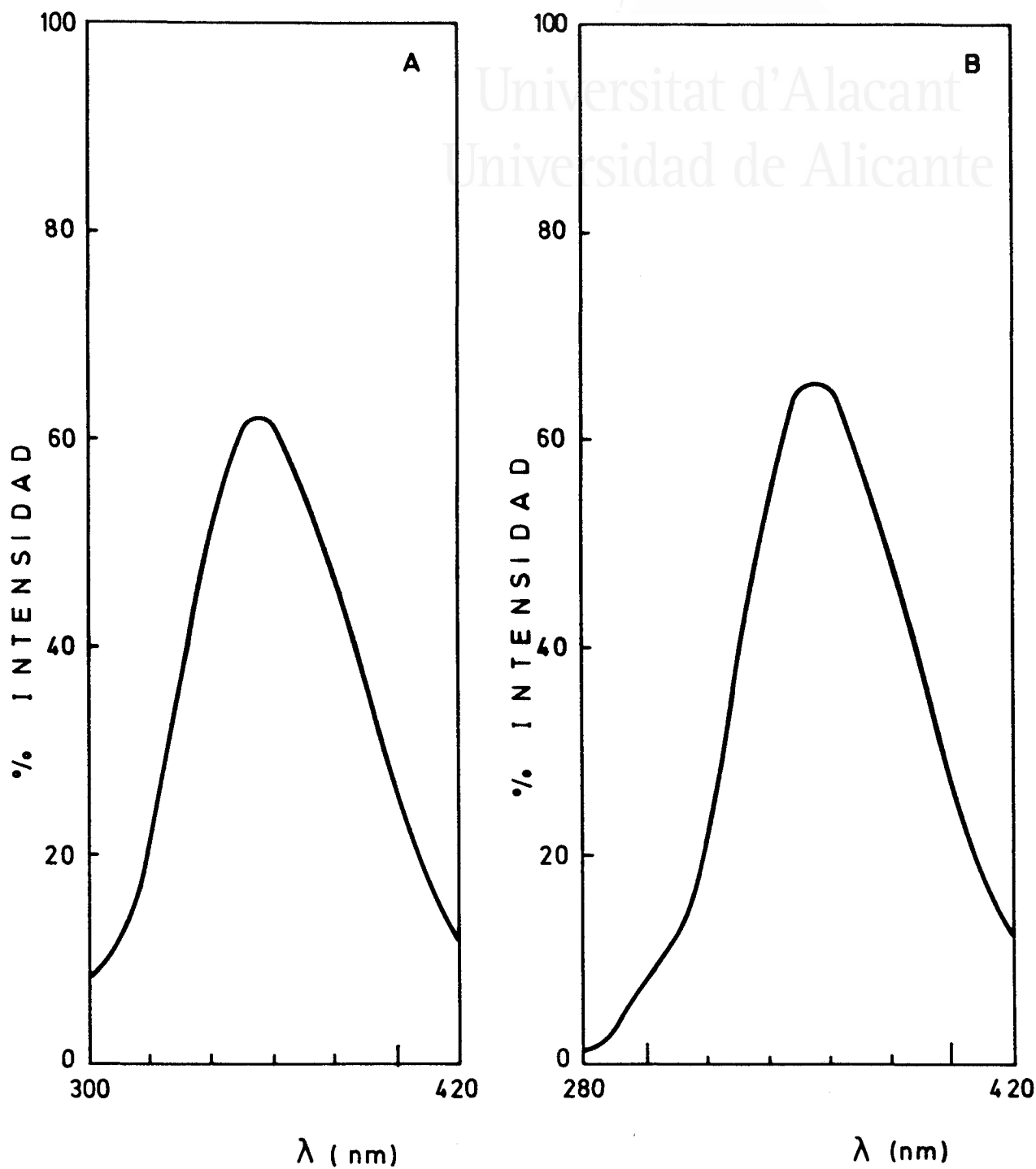


Figura 6 : Espectros de emisión producidos por una disolución 10^{-4} M compuesta por triptófano y tirosina en la misma proporción, en tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 con NaCl 4M, y excitando a 295 nm (A) y a 275 nm (B).



3.2.14.- Estudio del mecanismo cinético.

3.2.14.1.- Método de velocidades iniciales.

Los datos de las velocidades iniciales para una reacción con tres sustratos generalmente dan representaciones de Lineweaver-Burk respecto a cada sustrato, para cualquier concentración fija de los otros dos. En la desaminación oxidativa se varió la concentración de uno de los sustratos a varios niveles fijos del otro, sin haber productos presentes. Se representaron las inversas de las velocidades iniciales frente al inverso de la concentración del sustrato A a diferentes concentraciones fijas de B. Las pendientes y ordenadas se representaron como una función de $1/B$ en una representación secundaria. Del mismo modo se representaron todas estas funciones a la inversa, es decir, lo que primero fue A pasó a ser B y viceversa.

Para la NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* la reacción se siguió midiendo la aparición (desaminación) o desaparición (aminación) de NADH a 340nm y a 40°C. La cubeta, con los sustratos adecuados, se llevó a esa temperatura y la reacción empezó por la adición de la enzima. La mezcla de reacción contuvo tampón glicina-NaOH 0.1M de pH 9.0 con NaCl 3M y AEDT 3.25mM, para los dos sentidos de la reacción, y las concentraciones de los sustratos se indican en los resultados y en los pies de las figuras y tablas correspondientes. El volumen final fue de 2ml.

3.2.14.2.- Estudio de inhibición por producto.

Tanto para un sentido como para otro de la reacción se determinaron de forma habitual las velocidades iniciales, pero incluyendo diferentes niveles de inhibidor (en este caso, cada uno de los productos) en la mezcla de reacción.

En la inhibición por producto, éstos son los dos sustratos de la reacción inversa y es de esperar que formen complejos con la enzima. El tipo de inhibición esperado depende de cuál sea el sustrato variable y cuál sea el producto que actúe como inhibidor, y un estudio completo de inhibición por producto implicó utilizar cada producto como inhibidor frente a cada sustrato variable.

3.2.14.3.- Estudio de inhibición por análogos de sustratos.

Cuando un sustrato y un análogo suyo compiten por el mismo sitio de la enzima, el resultado es una inhibición. La disminución de la velocidad está relacionada con las velocidades que deberían esperarse si cada sustrato fuese ensayado en ausencia del otro.

Para la NAD-glutamato deshidrogenasa de *H. halobium* se estudió el efecto de hidroxilamina como análogo del amonio y el glutarato como análogo del 2-oxoglutarato. La forma de hacerlo fue la misma que en la inhibición por producto, pero en este caso incluyendo en la mezcla de reacción diferentes niveles de cada uno de estos análogos.

3.2.15.- Tratamiento estadístico de los datos cinéticos.

Las inversas de las velocidades se representaron gráficamente frente a las inversas de las concentraciones de los sustratos. Los datos experimentales fueron fijados a las ecuaciones 1-8 por el método de mínimos cuadrados suponiendo varianzas iguales para "v" o "log y" (Wilkinson, 1961) con los programas de FORTRAN desarrollados por Cleland (1979) con un ordenador de la marca UNISYS, modelo 4 y en el Sistema 80 del Centro de Cálculo de la Universidad de Alicante. Estos programas dan estimaciones cuadradas mínimas de los valores de los parámetros cinéticos y el error estándar asociado a cada parámetro, así como los factores de peso para posteriores análisis.

En los modelos de velocidades iniciales, cada línea de la representación doble inversa se ajustó a la ecuación $v = VA/(K+A)$ y las ordenadas y pendientes resultantes se representaron frente a la inversa de la concentración de cada uno de los otros sustratos para determinar si los efectos de ordenada o pendiente fueron lineales o parabólicos.

Por otra parte, los datos correspondientes a los patrones de velocidades iniciales intersecantes para una adición ordenada o una ordenada en equilibrio de dos sustratos se ajustaron a las ecuaciones 1-2 respectivamente,

$$v = VAB / [K_aB + K_bA + AB + K_{ia}K_b] \quad (1)$$

$$v = VAB / [K_bA + AB + K_{ia}K_b] \quad (2)$$

Los datos correspondientes a una inhibición competitiva, no competitiva (mixta) o acompetitiva se ajustaron a las ecuaciones 3-5, respectivamente,

$$v = VA / [K (1 + I/K_{iS}) + A] \quad (3)$$

$$v = VA / [K (1 + I/K_{iS}) + A (1 + I/K_{ii})] \quad (4)$$

$$v = VA / [K + A(1 + I/K_{ii})] \quad (5)$$

y las representaciones secundarias de ordenadas ($1/V$) y pendientes (K/V) se ajustaron a la ecuación de una recta, una parábola, o una hipérbola de este tipo

$$y = a (1 + X/K_{in}) / (1 + X/K_{id})$$

donde "y" es el parámetro cinético y "X" es la concentración de inhibidor o la inversa de la concentración de sustrato.

Los perfiles de pH se ajustaron a las ecuaciones siguientes, dependiendo de si descendía la curva por encima de pK_2 y por debajo de pK_1 (ec. 6), sólo por debajo de pK_1 (ec. 7) o sólo por encima de pK_2 (ec. 8):

$$\log y = \log [c / (1 + H/K_a + K_b/H)] \quad (6)$$

$$\log y = \log [c / (1 + H/K)] \quad (7)$$

$$\log y = \log [c / (1 + K/H)] \quad (8)$$

donde "y" es el parámetro cinético, K_a y K_b son las constantes de ionización de los grupos que se ionizaban, y "c" es el valor de "y" en el estado óptimo de protonación.

En todas las ecuaciones, la nomenclatura utilizada fue la de Cleland (1979).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1.-PURIFICACION DE DOS ACTIVIDADES GLUTAMATO DESHIDROGENASAS.

Un hecho característico de muchas proteínas de bacterias halofílicas es su inestabilidad a bajas concentraciones (<0.5M) de sales neutras (Leicht y col., 1978). Esta inestabilidad ha perjudicado diversos intentos de purificar enzimas de fuentes halofílicas, debido a que la mayoría de las técnicas de purificación se desarrollan bajo condiciones de baja salinidad que originan en las proteínas y enzimas halofílicas una pérdida de su estructura nativa y de su actividad; sin embargo, hay otras enzimas halofílicas 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 las enzimas halofílicas estudiadas se inactivan irreversiblemente en ausencia de concentraciones elevadas de sales neutras y esto hace difícil su purificación y caracterización (Norberg y van Hofsten, 1970), algunas enzimas pueden renaturalizarse por un nuevo aumento de la concentración salina (Mevarech y Neumann, 1977).

Inicialmente, para la elaboración del trabajo correspondiente a la Tesis de Licenciatura (Camacho, 1984) se obtuvo la actividad NAD-GDH de *H.halobium* mediante cromatografía hidrofóbica en Sepharosa-4B, pero además se detectó la presencia de otras fracciones con una pequeña actividad glutamato deshidrogenasa, en otra posición

distinta, reservándolas para posteriores estudios que revelaron la presencia de NADP-GDH en *H.halobium*.

Para separar las dos actividades de glutamato deshidrogenasas de *H.halobium*, el extracto libre de células se introdujo en una columna de Sepharosa-4B equilibrada con tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.6. La cromatografía se desarrolló utilizando un gradiente de concentración decreciente de sulfato amónico entre 2.5 y 0.5M disuelto en el tampón anterior. Como se muestra en la Fig.7 las actividades glutamato deshidrogenasas se eluyeron en dos picos. La actividad GDH presentó un pico I dependiente de NADP como coenzima mientras que no fue detectable la reacción con NAD. En el pico II se presentó la actividad GDH dependiente completamente de NAD como coenzima.

El método de fraccionamiento en Sepharosa con sulfato amónico (Mevarech y col., 1976) permite manejar grandes cantidades de proteína, tiene un buen poder de separación y suele ser el método de elección para la etapa de utilización del extracto crudo. Fue utilizado por Mevarech y col. (1976, 1977) para separar NADP-glutamato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa de *Halobacterium* del Mar Muerto. Pero hay que tener en cuenta que el método aplicado para este Trabajo es una modificación del empleado por Mevarech y col. (1976), ya que se eliminó una etapa de diálisis en la cual se perdía parte de la actividad glutamato deshidrogenasa. Otra ventaja de utilizar este método radica en que, durante la adsorción y la elución, las proteínas permanecen en disolución y se evitan los efectos adversos (como una pérdida irreversible de actividad) que pudieran producirse por precipitación.

Las proteínas halofílicas son solubles a la elevada concentración de sulfato amónico (2.5M) utilizada en esta etapa, y a esta concentración casi todas las proteínas halofílicas se retienen en Sepharosa (Mevarech y col., 1976).

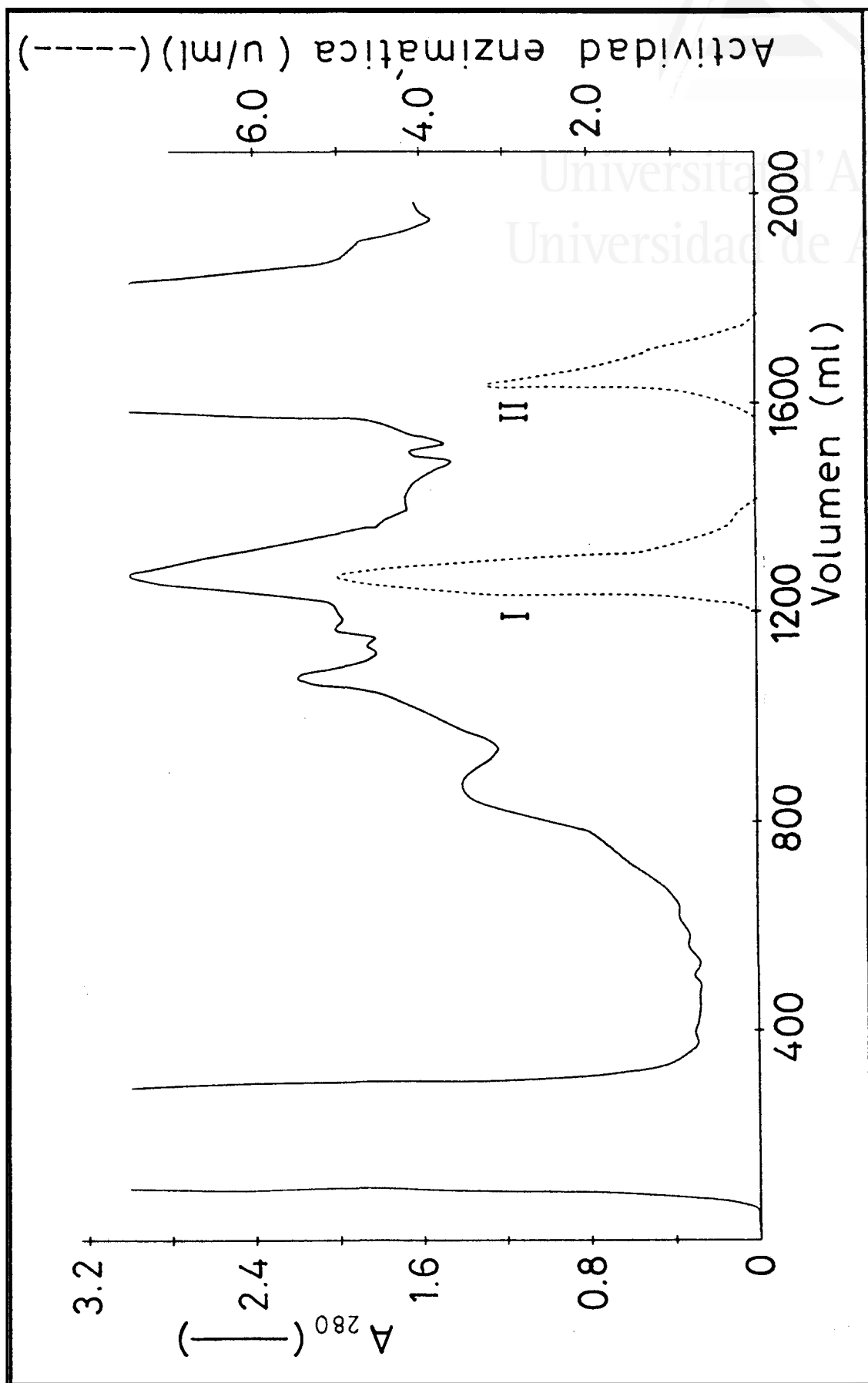


Figura 7 : Cromatografía hidrofóbica en Sepharosa-4B empleando un gradiente continuo decreciente lineal de sulfato amónico desde 2.5M a 0.5M, en tampón fosfato sódico 0.5M pH 6.6. La actividad NADP-GDH aparece en el pico I, y la NAD-GDH en el pico II. La proteína se presentó como absorbancia a 280 nm, y se utilizó una velocidad de flujo de 48 ml/h recogiendo fracciones de 16 ml.

Las más solubles en esta sal eluyen primero, por lo tanto, entre las dos actividades estudiadas en el presente Trabajo, fue más soluble la NADP-GDH que la NAD-GDH, observándose que mientras la GDH NAD-dependiente eluyó a 1.5M de sulfato amónico (Camacho, 1984) la NADP-dependiente lo hizo antes, a una concentración 1.6M. Ya que los geles de Sepharosa están esencialmente descargados y las proteínas se adsorben en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 2.5M, queda claro que las fuerzas electrostáticas no están implicadas en la unión. Además, este método requiere elevadas concentraciones de aniones tales como sulfato, y no trabajan con aniones tales como cloruro. Por tanto, las interacciones implicadas en la adsorción de enzimas halofilicas en Sepharosa, probablemente, son de naturaleza hidrofóbica "pura" ya que, como es sabido, este tipo de interacción está favorecido por las elevadas concentraciones de estos aniones (Mevarech y col., 1976).

A partir de este momento se mantuvieron separadas ambas actividades y los siguientes pasos de purificación se desarrollaron independientemente.

4.1.1.- Purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente.-

La muestra obtenida en la cromatografía de Sepharosa-4B siguió un proceso de purificación mejorado respecto al de la Tesis de Licenciatura (Camacho, 1984) en cuanto a los tampones utilizados y al complemento de dos nuevas etapas de purificación. Después de la cromatografía en DEAE-celulosa se añadió una de tamizado molecular en Sepharosa-4B, obteniéndose un factor de purificación de 19.2. A continuación de la cromatografía en Sephadex G-100 se realizó una en

hidroxiapatito, que fue la etapa final del proceso, obteniéndose un factor de purificación de 126 (Bonete y col., 1986) (Tabla 6).

4.1.2.- Purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente.-

Después de la cromatografía en Sepharosa-4B se realizó una en DEAE-celulosa, utilizando los mismos tampones que la NAD-dependiente (Bonete y col., 1986).

En el caso de DEAE-celulosa las fuerzas electrostáticas llegan a ser dominantes antes de que las interacciones hidrofóbicas hayan disminuido. Así, la actividad no puede eluirse con sulfato amónico y sólo lo hace cuando éste es sustituido por una sal tal como NaCl, que reduce las fuerzas de atracción electrostática, sin estimular a las interacciones hidrofóbicas (Mevarech y col., 1976). Con la purificación de glutamato deshidrogenasa en DEAE-celulosa se intenta conseguir una cromatografía hidrofóbica para las actividades contaminantes eluyendo en sulfato amónico y, al mismo tiempo, una cromatografía de intercambio iónico para la actividad que es objeto de estudio utilizando NaCl (Mevarech y col., 1976), así como una concentración de la actividad enzimática.

La siguiente etapa fue una cromatografía de tamizado molecular en Sepharosa-4B. El comportamiento de elución de la actividad purificada se muestra en la Figura 8. Aparecieron dos máximos de proteína bien definidos, pero sólo el segundo de ellos contenía la actividad NADP-GDH.

TABLA 6

Purificación de NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*.

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mg)	Grado purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto crudo	152	2401.6	0.10	1	100
2. Sepharosa -4B	115	93.2	1.27	12.7	47
3. DEAE-celulosa	5	54.0	1.37	13.7	29
4. Sepharosa -4B	19	24.7	1.92	19.2	19
5. Sephadex G-100	17	11.0	2.78	27.8	12
6. Hidroxiapatito	15	1.0	12.60	126.0	5



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Cromatografía en Sepharosa-4B NADP-GDH

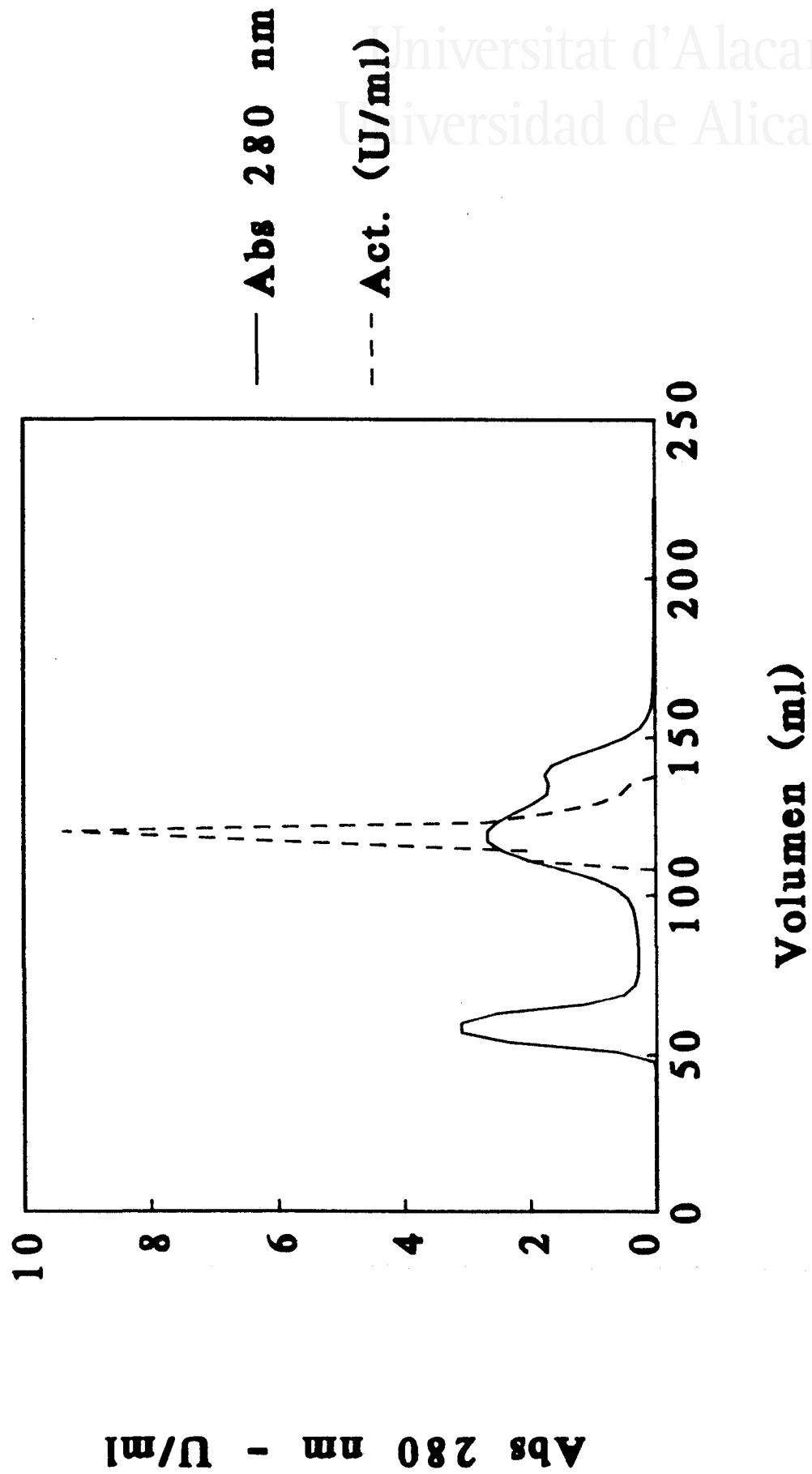


Figura 8 : Purificación de la actividad NADP-GDH de *H.halobium* mediante una cromatografía de tamizado molecular en Sepharosa-4B. Se realizó a una velocidad de flujo de 30 ml/h y se recogieron fracciones de 3 ml, empleando tampón fosfato sódico 0.05M de pH 7.3 con NaCl 4M para la elución.

Después se realizó una cromatografía en Sephadex G-100. En la Fig.9 se puede observar el cromatograma obtenido, en el que el pico de proteína coincide completamente con el de elución de la actividad enzimática.

La última etapa del proceso de purificación de la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente de *H.halobium* consistió en una cromatografía en hidroxapatito que se desarrolló con un gradiente discontinuo de concentraciones de tampón fosfato sódico entre 0.05M y 0.3M, de pH 7.3. La Fig.10 presenta el cromatograma obtenido, observándose que la actividad eluyó a 0.1M de tampón. Se utilizó este soporte ya que el hidroxapatito 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 (Bernardi y Kawasaki, 1968), y que la adsorción a hidroxapatito depende de este contenido, se pensó que dicho método, aplicado anteriormente para una proteasa halofílica (Norberg y van Hofsten, 1970), podría dar buenos resultados con glutamato deshidrogenasa de *H.halobium*. En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos a través de todo el proceso, considerando cada una de las etapas.

Como resultado final del proceso de purificación a que se sometió el extracto de *H.halobium* conteniendo las dos actividades estudiadas se logró separar y purificar las mismas (NAD- y NADP-dependiente), obteniéndose unos factores de purificación de 126 y 252 veces, respectivamente, respecto a las actividades mostradas en el extracto original.

Las fracciones obtenidas, tanto de la NADP-GDH como de la NAD-GDH, después de todo el proceso de purificación se sometieron a varias electroforesis en geles de poliacrilamida según lo descrito en el apartado "Materiales y

Cromatografía en Sephadex G-100
NADP-GDH

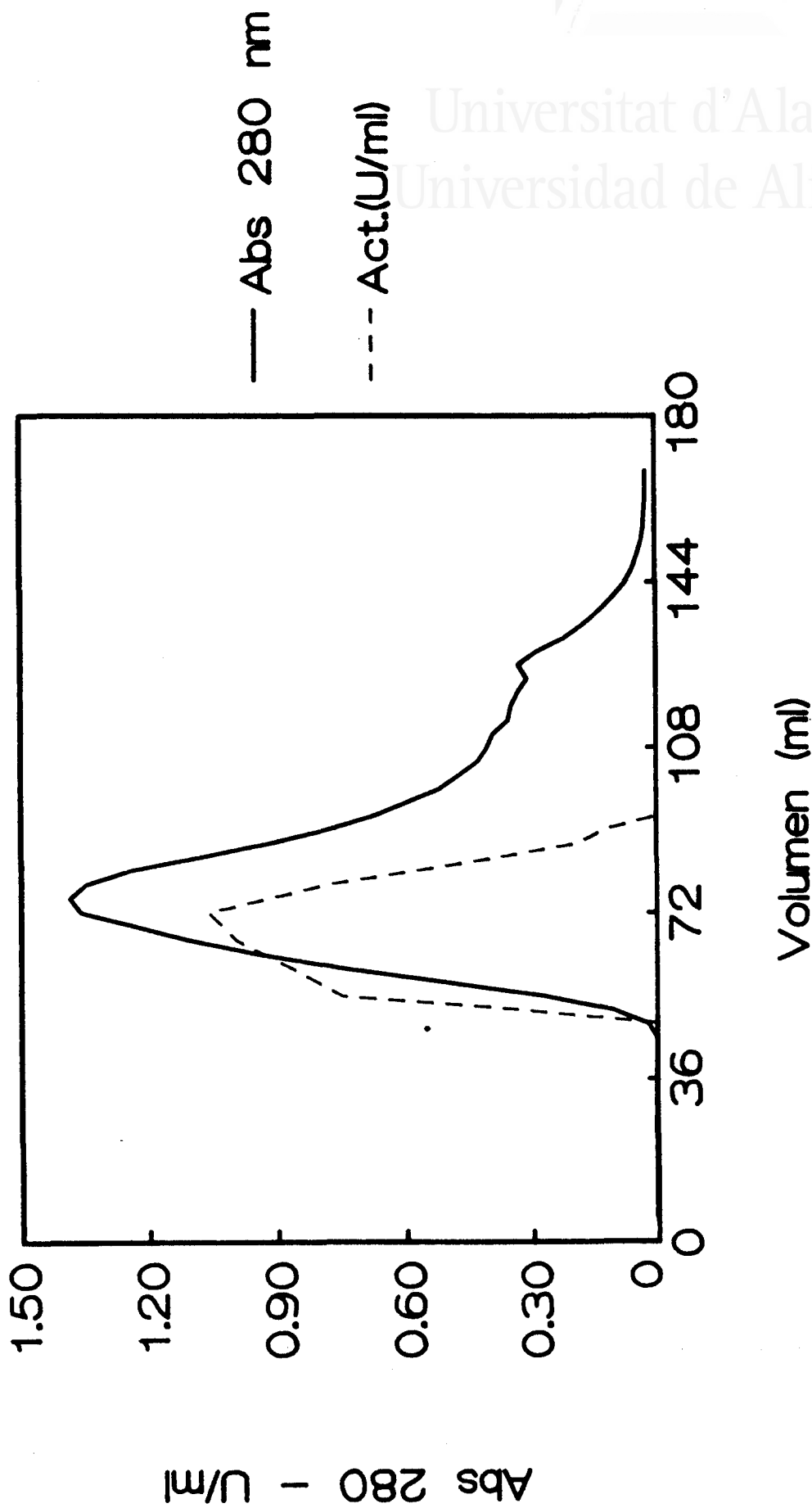


Figura 9 : Cromatografía de tamizado molecular en Sephadex G-100, para NADP-GDH de H.halobium. Se realizó a una velocidad de flujo de 35 ml/h y se recogieron fracciones de 3 ml, empleando tampón fosfato sódico 0.05M de pH 7.3 con NaCl 4M para la elución.

Cromatografía en Hidroxiapatito NADP-GDH

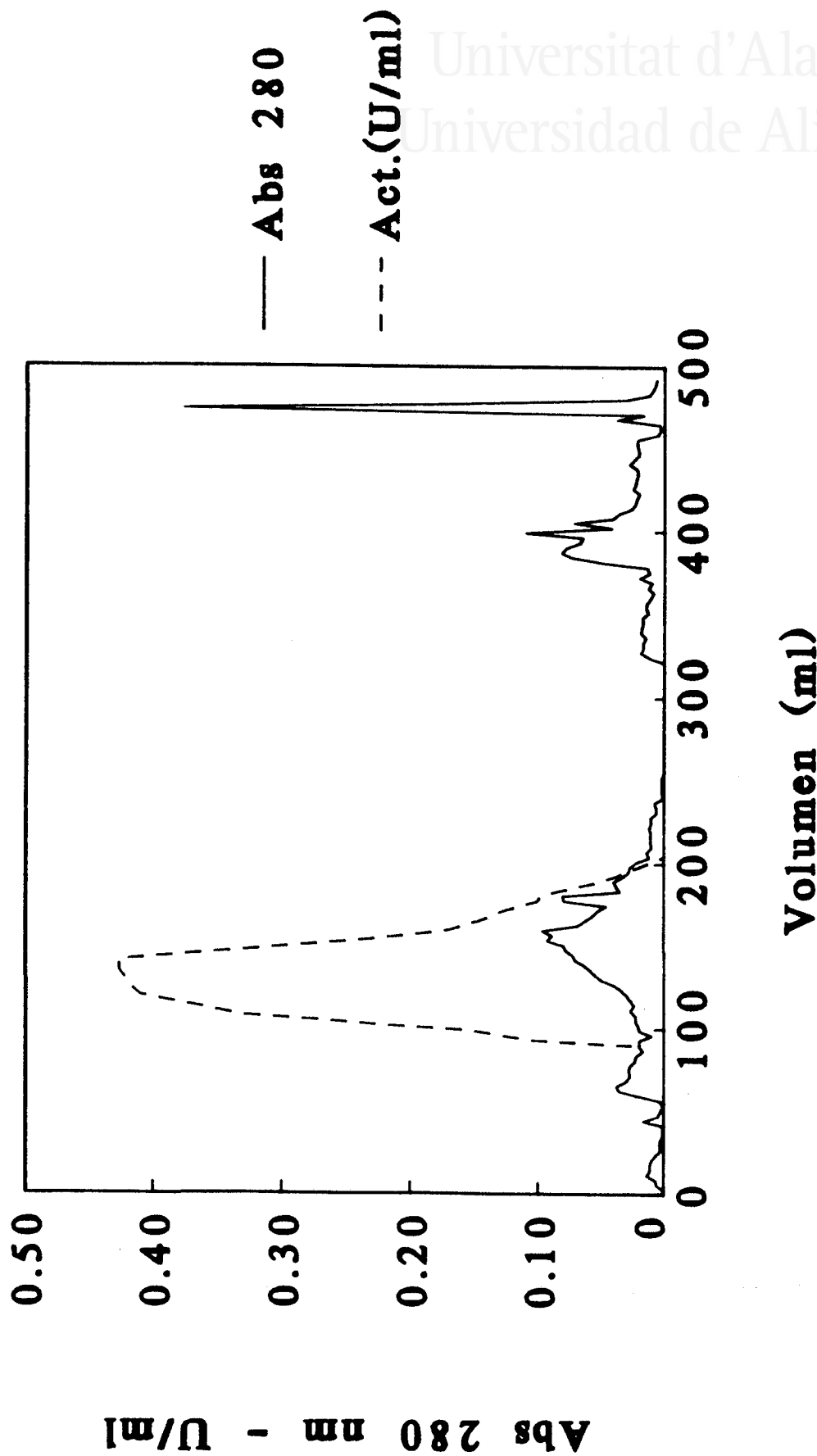


Figura 10 : Purificación de la actividad NADP-GDH por medio de una cromatografía en hidroxiapatito, utilizando un gradiente discontinuo creciente de tampón fosfato sódico a concentraciones desde 0.05M a 0.3M, todas a pH 7.3 y conteniendo NaCl 4M (salvo el 0.3M). Velocidad empleada: 20 ml/h. Volúmen de las fracciones: 3 ml.

TABLA 7

Purificación de NADP-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*.

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mg)	Grado purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto crudo	421	6045	0.25	1	100
2. Sepharosa-4B	287	2104	0.83	3	118
3. DEAE-celulosa	35	68	8.82	35	37
4. Sepharosa-4B	48	29	11.35	45	20
5. Sephadex G-100	63	22	12.41	50	17
6. Hidroxiapatito	183	2.4	63.00	252	9

Métodos", eliminando previamente el contenido salino mediante diálisis frente a tampón sin sales. Por este procedimiento electroforético se pudo observar que las preparaciones finales no fueron completamente homogéneas.

Dado que en *H.halobium* existen dos actividades de glutamato deshidrogenasa, asignadas a diferentes fracciones cromatográficas, la etapa siguiente de este Trabajo consistió en la caracterización de las mismas como dos enzimas diferentes y no como dos actividades de la misma proteína.

4.2. CARACTERIZACION DE DOS GLUTAMATO DESHIDROGENASAS: NAD-ESPECIFICA Y NADP-ESPECIFICA.

4.2.1.- pH óptimo y razones de actividad.-

Para determinar el pH óptimo de actuación de la NAD-GDH de *H.halobium* se realizaron ensayos de actividad en un rango de pHs comprendido entre 6.0 y 10.2. Se utilizó tampón fosfato sódico 0.1M en un intervalo de pH de 6.0 a 7.2, tampón Tris-HCl 0.1M en el rango de 7.6 a 9.0, tampón carbonato-bicarbonato 0.1M desde 9.0 a 10.2 o tampón glicina-NaOH 0.1M de 9.0 a 10.5.

La influencia del pH en la velocidad inicial de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato y de la desaminación oxidativa del L-glutamato aparece en la Fig.11. Como se puede observar para NAD-GDH, la reacción de aminación presentó la máxima actividad a pH 9.0 y la desaminación a pH 8.0 (Camacho, 1984; Bonete y col., 1986).

Inicialmente, para el rango de pHs más elevado se utilizó tampón carbonato-bicarbonato, observándose un efecto de la naturaleza del tampón, ya que a pH 9.0, la actividad enzimática con carbonato-bicarbonato fue sólo del 53% con respecto a Tris-HCl al mismo pH. A continuación se realizó este estudio utilizando tampón glicina-NaOH para el mismo rango de pHs alcalinos, empleado por Keradjopoulos y Holldorf (1977) para la determinación de las condiciones óptimas de pH de algunas enzimas halofílicas, entre ellas glutamato deshidrogenasa. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad enzimática, a pH 9.0 con este tampón, aumentó 8.4 veces con respecto a la de tampón Tris-HCl. Esta diferencia tan elevada de actividad enzimática hizo pensar

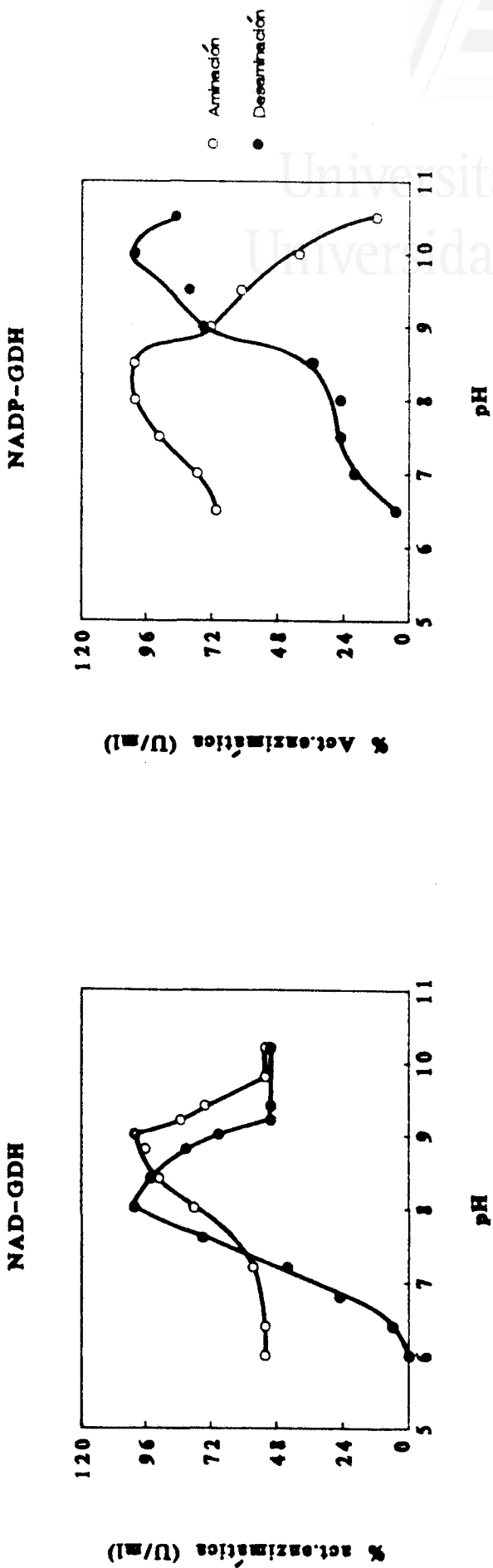


Figura 11 : Efecto del pH en las dos enzimas de *H.halobium*, a 40° C. Las condiciones de medida en ambas direcciones de la NAD-GDH y en la aminación de la NADP-GDH se expresan en Materiales y Métodos. La mezcla de reacción para la desaminación oxidativa de NADP-GDH contenía NADP⁺ 0.1mM y L-glutamato 50mM, en el tampón correspondiente 0.1M y con NaCl 4M.

en un nuevo estudio sobre el pH óptimo, pero esta vez utilizando tampón carbonato-bicarbonato para la zona alcalina y añadiendo una disolución de glicina 80mM al medio de reacción, en todo el rango de pHs.

Cuando al medio de reacción de la NAD-GDH se le adicionó glicina 80mM, el pH óptimo aumentó en ambas direcciones; para la reacción de aminación pasó a ser de 9.4 mientras que para la desaminación fue de 9.0. Con la adición de dicho aminoácido la actividad aumentó en ambas direcciones; se observó un aumento de doce veces para la aminación y de cuatro veces para la desaminación, al pH óptimo de cada reacción. Este resultado indujo a pensar que dicho aminoácido fuese un activador de NAD-GDH de *H.halobium*, al igual que ocurre con la leucina y la enzima bovina. Posteriormente se realizaron estudios sobre la posible activación por diferentes aminoácidos, resultados que se expondrán en otro apartado del presente Trabajo.

Para analizar el efecto del pH sobre la actividad de la NADP-GDH se utilizó tampón fosfato sódico 0.1M en el intervalo 6.5 - 7.5, tampón Tris-HCl 0.1M desde 7.5 a 9.0 y tampón glicina-NaOH 0.1M en el rango 9.0 - 10.5. Bajo las condiciones de ensayo utilizadas, la actividad máxima para la oxidación de NADPH se obtuvo a pH 8.0 - 8.5 (Fig. 11), mientras que para la reducción de NADP^+ se obtuvo a pH 10.0 (Bonete y col., 1987). En *H.halobium*, al pH óptimo de cada reacción, la velocidad de aminación catalizada por la NADP-GDH fue 5.4 veces más elevada que la de desaminación, mientras que para la NAD-GDH sus actividades estuvieron más cercanas, la de aminación fue sólo 1.5 veces la de desaminación.

En la Tabla 8 se pueden observar los pHs óptimos para la aminación de 2-oxoglutarato y la oxidación de L-glutamato por NAD- ó NADP-GDH de diversas fuentes. La reacción de aminación para la mayoría de las GDHs es óptima en el rango

TABLA 8

Valores de pHs óptimos para glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes.

FUENTE	ESPECIF. COENZIMA	pH óptimo	
		AMINACION	DESAMINACION
Levadura (Grisolia y col., 1964)	NADP	8.0	7.6
Músculo cangrejo (Chaplin y col., 1965)	NAD	8.1	8.6
<i>N.europaea</i> (Hooper y col., 1967)	NADP	7.7	8.4-10.0
<i>T.novellus</i> (LéJohn y col., 1968)	NADP	7.5	9.0-9.5
<i>B.flavum</i> (Shio y Ozaki, 1970)	NADP	7.5	8.8
<i>Clostridium</i> SB ₄ (Winnacker y Barker, 1970)	NAD	7.8	9.4
Cotiledón de semilla de soja (King y Wu, 1971)	NAD	8.0	9.3
<i>B.emersonii</i> (Sanner, 1971)	NAD	7.9	8.8
<i>Coprinus lagopus</i> (Fawole y Casselton, 1972)	NADP NAD	7.8 8.6	9.6 10.0
<i>M.laidlawii</i> (Yarrison y col., 1972)	NAD NADP	9.1 8.9	9.6 8.9
<i>S.typhimurium</i> (Coulton y Kapoor, 1973a)	NADP	7.5-8.6	---
Hígado bovino y pollo (Smith y Piszkiwicz, 1973)	NAD	7.8	8.5-9.0
<i>N.crassa</i> (Blumenthal y Smith, 1975)	NADP	7.6	8.6-9.0

FUENTE (contin.)	ESPECIF. COENZIMA	pH óptimo	
		AMINACION	DESAMINACION
<i>T. bacillus</i> (Epstein y Grossowicz, 1975)	NADP	7.2	8.4
<i>E. coli</i> (Sakamoto y col., 1975; Veronese y col., 1975)	NADP	7.9-8.0	9.0
<i>S. cerevisiae</i> (Camardella y col., 1976)	NADP	6.9	7.7
Cerebro de rata (Gonzalez y col., 1976)	NAD	7.4	7.4-7.8
<i>Metridium seline</i> (Bishop y col., 1978)	NADP	7.4	8.2
<i>Lobaria laetevirens</i> (Bernard y Goas, 1979)	NADP	7.7	8.9
<i>Sphaerostilbe repens</i> (Botton y Msatet, 1983)	NADP	6.9	8.4
<i>A. xanthogrammica</i> (Male y Storey, 1983)	NADP	7.0	8.5
<i>Pseudomonas (Methylobacterium) AM1</i> (Bellion y Tan, 1984)	NADP	9.0	9.0
<i>L. fermentum</i> (Misono y col., 1985)	NADP	8.0	9.0
<i>A. brasilense</i> (Maulik y Ghosh, 1986)	NADP/NAD	8.5-8.6/ --	8.8/ --
<i>Hyphomicrobium X</i> (Duchars y Attwood, 1987)	NADP	8.5	--
<i>N. hamburgensis</i> (Weining y Nicholas, 1987)	NADP	7.5	8.5
<i>B. fragilis</i> (Yamamoto y col., 1987)	NAD ó NADP	7.4 ó 8.0	9.0 ó 9.5
<i>Phycomyces</i> (van Laere, 1988)	NAD	8.0-8.5	9.0
<i>H. halobium</i> (este Trabajo)	NAD NADP	9.0 8.0-8.5	8.0 10.0

de pH 7.4 - 8.0, mientras que la desaminación está en la región de 8.5 - 9.5. Los datos de esta Tabla varían considerablemente en cuanto a las condiciones utilizadas para las determinaciones, lo que podría reflejar algunas de las pequeñas diferencias observadas en cuanto al pH. En algunos casos, las concentraciones de sustrato no fueron lo suficientemente altas para reflejar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ (Smith y col., 1975). Además hay otras enzimas de *H.halobium* que se están estudiando en la División de Bioquímica y que presentan pHs elevados: malato deshidrogenasa (Cadenas, 1985; Cano, 1987) actuó a pH 9.6 en las dos direcciones; alanina deshidrogenasa (Lucendo, 1986; Sahagún, 1988) lo hizo a pH 8.6 - 9.0 en los dos sentidos de reacción e isocitrato deshidrogenasa (Jurado, 1985) que presentó un pH óptimo de 8.4 en la reducción del NADP⁺.

La glutamato deshidrogenasa de la larva de mosca *E.solidaginis* (Male y Storey, 1982) presenta doble especificidad de coenzima, con NADP⁺ muestra un pH óptimo de 6.75 en la aminación y de 7.5 en la desaminación y con NAD⁺, pHs óptimos de 7.5 y 8.0 para la aminación y desaminación, respectivamente. La relación de actividad entre las direcciones de desaminación y aminación (a los pHs óptimos respectivos) fue de 1:10 para NAD⁺/NADH y 1:20 para NADP⁺/NADPH, relaciones semejantes a las obtenidas por Smith y Pizskiewicz (1973) para la GDH de hígado bovino (1:15) o por Male y Storey (1983) para la NADP-GDH de *A.xanthogrammica* que fue de 1:10, sugiriendo una función enzimática primaria en la biosíntesis de glutamato. Estas relaciones fueron más elevadas que las obtenidas para ambas glutamato deshidrogenasas de *H.halobium*, ya que para NAD-GDH esta relación fue de 1:1.5, y para la NADP-GDH fue 1:5. Estos valores parecen favorecer, en principio, ambos sentidos de reacción, por lo que no se puede deducir si habrá un predominio de la biosíntesis o del catabolismo del L-glutamato.

La enzima de *A.xanthogrammica* (Male y Storey, 1983) presentó un pH óptimo de 7.0 cuando reaccionó con amonio y de 8.0 cuando lo hizo con L-glutamina que actuó como sustrato alternativo del amonio. La GDH de *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) también presentó doble especificidad de coenzima, pero los estudios de pH los llevaron a cabo trabajando con NADPH, obteniendo la actividad máxima de aminación a un pH de 8.5-8.6 cuando utilizaron tampón Tris-HCl, mientras que con tampón fosfato potásico se mantuvo en un máximo de actividad desde pH 8.4 a 10.0. En el rango de pH entre 8.0 y 9.0 la velocidad de reacción en tampón fosfato fue mayor que en Tris-HCl. La glutamato deshidrogenasa de *B.fragilis* (Yamamoto y col., 1987) también presentó una especificidad doble, pero dependiendo de la coenzima utilizada los pHs óptimos variaron en ambos sentidos de la reacción (Tabla 8). Como se puede observar en la Tabla 8, la desaminación oxidativa presentó pHs óptimos más elevados que la correspondiente aminación reductiva, salvo en los casos de la enzima de levadura y de la NAD-dependiente estudiada en el presente Trabajo, tanto si se añadió glicina como si no.

4.2.2.- Temperatura óptima de actuación.

Estudios realizados anteriormente (Camacho, 1984) dieron como resultado que la temperatura óptima a la cual la NAD-GDH de *H.halobium* presentó mayor actividad fue de 70°C, tanto en la aminación reductiva como en la desaminación oxidativa (Fig.12) (Bonete y col., 1986). De igual modo se estudió el efecto de la temperatura óptima para la NADP-GDH en la aminación reductiva del 2-oxoglutarato, entre 25°C y 85°C (Fig.12), encontrándose el mismo valor óptimo que en la NAD-GDH, 70°C (Bonete y col., 1987). Estos valores tan

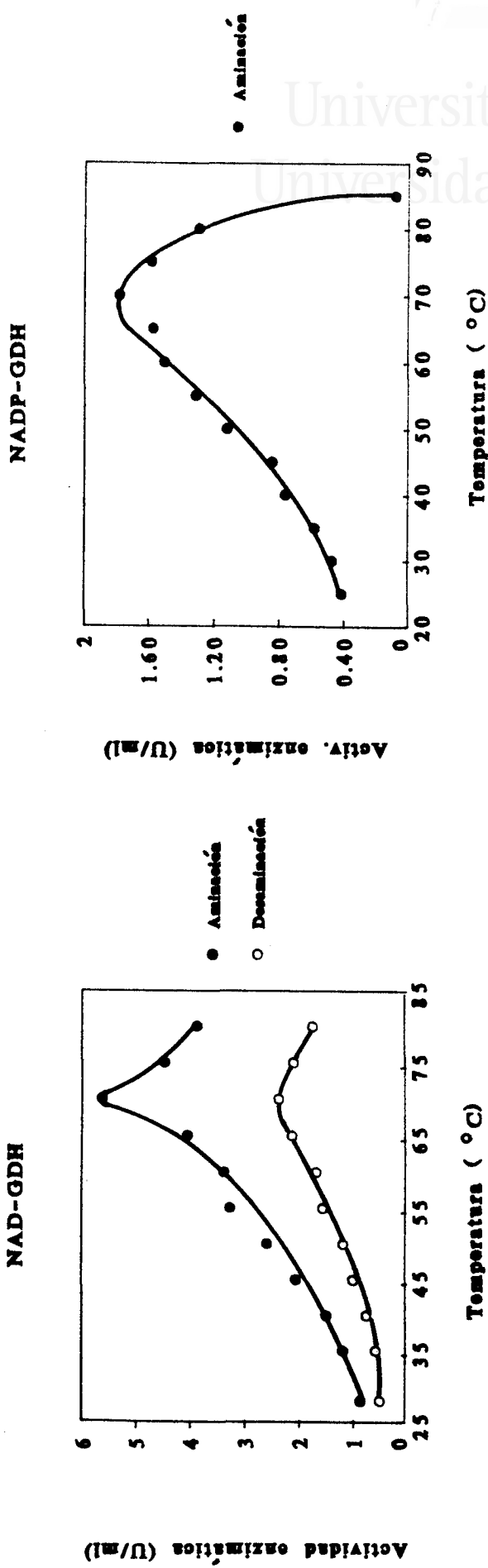


Figura 12 : Dependencia de la temperatura para ambas enzimas glutamato deshidrogenasas en la aminación reductiva. En el caso de la NAD-GDH aparece también la dirección de desaminación. El ensayo se realizó bajo condiciones estándar.

elevados pueden reflejar el carácter termofílico de la Halobacteria, como ocurre con otras deshidrogenasas halofílicas (Keradjopoulos y Wulff, 1974; Keradjopoulos y Holldorf, 1977). Las demás enzimas estudiadas en el Departamento presentaron temperaturas óptimas de 55°C para malato deshidrogenasa (Cadenas, 1985; Cano, 1987) e isocitrato deshidrogenasa (Jurado, 1985), y de 50°C para alanina deshidrogenasa (Lucendo, 1986), todas ellas de *H.halobium*.

Un estudio realizado con nueve enzimas (entre ellas la glutamato deshidrogenasa) de tres cepas halofílicas, *H.salinarium*, *H.halobium* NRL y *H.cutirubrum* (Keradjopoulos y Holldorf, 1977) presentó temperaturas óptimas entre 55 y 70°C. Entre éstas se encontró NAD-GDH de *H.salinarium*, que mostró una temperatura óptima de 60°C en la dirección de aminación, algo menor que la obtenida en este Trabajo por la enzima de *H.halobium*. Para NADP-GDH de *H.cutirubrum* y *H.halobium* NRL se obtuvieron los valores de 60°C y 70°C, respectivamente, para la reacción de aminación. El valor mostrado por la enzima de *H.halobium* NRL fue idéntico al de la NADP-GDH de este Trabajo. Este termofilismo parece estar determinado por regiones muy limitadas de secuencias de polipéptidos, en las que las interacciones hidrofóbicas tienen una importancia especial (Keradjopoulos y Holldorf, 1979). Aunque no se conocen ni la composición de aminoácidos ni las estructuras primarias de estas proteínas halofílicas, sin embargo, los estudios sobre la conformación de las enzimas halofílicas en presencia de diferentes concentraciones salinas, dicroísmo circular y fluorescencia sugieren una base similar tanto para halofilismo como para termofilismo. Para el caso de las dos enzimas de *H.halobium* se podría decir que poseen carácter termofílico, ya que su valor óptimo entra en el rango de temperaturas característico de este tipo de arqueobacterias.

4.2.3.- Efecto de la concentración salina.-

Para determinar la concentración salina óptima de la aminación reductiva de 2-oxoglutarato se midieron las actividades de las dos glutamato deshidrogenasas de *H.halobium* en presencia de concentraciones crecientes de NaCl o KCl. Como se puede observar en la Fig. 13, la actividad de dichas enzimas aumentó considerablemente al aumentar la concentración salina en el medio de reacción, al igual que ocurre con otras enzimas halofílicas (Dundas, 1972; Lieberman y Lanyi, 1972; Norberg y col., 1973; Keradjopoulos y Wulff, 1974; Higa y Cazzulo, 1975; de Médicis y col., 1982; Danson y col., 1984; Cadenas, 1985; Jurado, 1985; Cano, 1987; May y Dennis, 1987; Sahagún, 1988). Los requerimientos salinos de NAD-GDH y NADP-GDH fueron diferentes. Así, la máxima actividad de NAD-GDH para la reacción de aminación se obtuvo a NaCl 3.2M ó KCl 0.8M, y en la desaminación a 0.4M de KCl ó 1M de NaCl, mientras que para la NADP-GDH la concentración óptima fue a 1.6M de NaCl ó KCl.

A concentraciones bajas de KCl, el efecto estimulador de esta sal fue mayor que el mostrado por NaCl a las mismas concentraciones, en el caso de NAD-GDH. La NADP-GDH fue también más activa en KCl que en NaCl.

Un aspecto interesante de la dependencia salina de la actividad es la preferencia de la enzima por potasio. Es probable que no sea una coincidencia que el KCl, el catión intracelular más abundante, sea también el mejor activador, ya que se ha demostrado que varias enzimas halofílicas también muestran actividades más altas en KCl que en NaCl (Kushner, 1986).

Keradjopoulos y Holldorf (1977) estudiaron los requerimientos salinos para nueve enzimas de tres cepas diferentes de Halobacterias, obteniendo valores óptimos desde 0.5M de

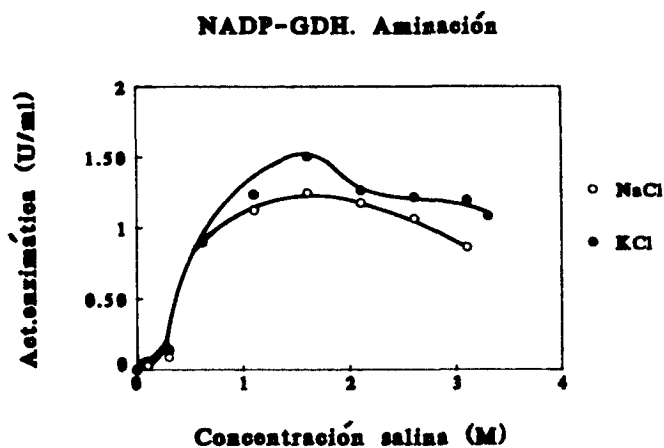
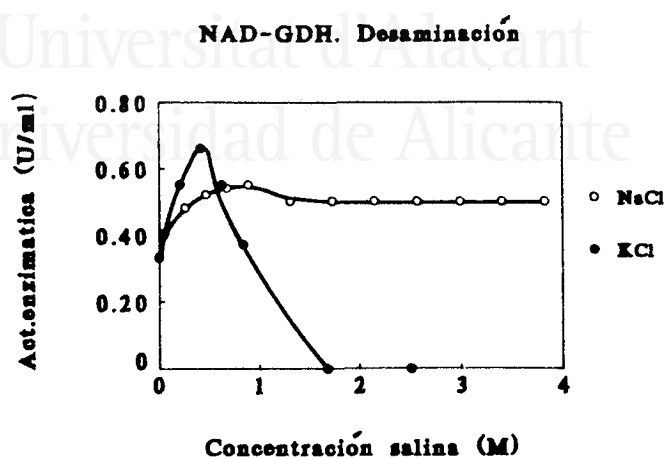
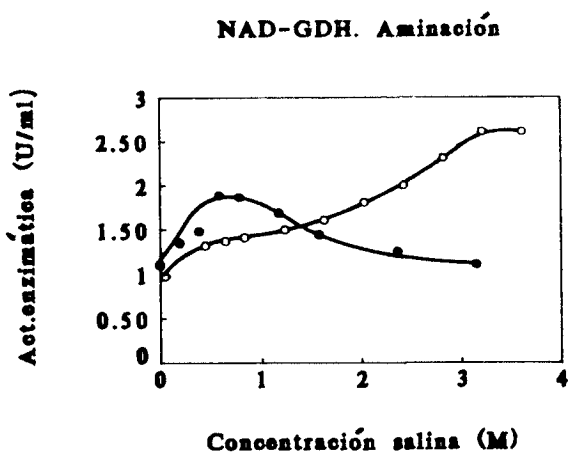


Figura 13 :

Efecto del NaCl (o) y del KCl (●) sobre la actividad enzimática en condiciones estándar. La NAD-GDH se presenta en los dos sentidos de la reacción, y la NADP-GDH en la dirección de aminación.

NaCl para isocitrato deshidrogenasa a 4.3M para glutamato y alanina deshidrogenasas. Entre estas enzimas se encuentran una NAD-GDH de *H.salinarium* con una concentración óptima a 4.3M de NaCl, valor algo superior al obtenido para la NAD-GDH de *H.halobium* (3.2M); en el caso de NADP-GDH, la concentración óptima varía de una cepa a otra; así, para la enzima de *H.cutirubrum* fue de 4.3M, la de *H.halobium* NRL fue de 2.6M, y para la de *H.marismortui* (Leicht y col., 1978) fue de 1.1M en NaCl. La NADP-GDH del presente Trabajo se asemeja más, en este aspecto, a la de *H.marismortui*.

4.2.4.- Especificidad de coenzima y sustrato.-

Como en el caso de otras fuentes (Smith y col., 1975) los extractos de *H.halobium* contuvieron ambas actividades NAD-GDH y NADP-GDH. La NADP-GDH no mostró actividad cuando el NADPH se reemplazó por NADH y, de igual forma, la NAD-GDH tampoco se mostró activa cuando se sustituyó NADH y NAD⁺, según la dirección de la reacción, por NADPH y NADP⁺, respectivamente (Bonete y col., 1986, 1987).

Algunas fuentes presentan dos enzimas glutamato deshidrogenasas, una específica de NAD⁺ y la otra de NADP⁺, como es el caso de varias especies de hongos (Sanwal,1961; Sanwal y Lata, 1961; Kato y col., 1962), *Thiobacillus novellus* (LéJohn y McCrea, 1968), *Hydrogenomonas H16* (Krämer, 1970), *Pseudomonas aeruginosa* (Janssen y col., 1980) o *Nitrobacter agilis* (Kumar y Nicholas, 1984). En cambio, muy pocas fuentes poseen una GDH que funcione con ambas coenzimas; se ha encontrado en tejidos animales (Frieden,1965), *Mycoplasma laidlawii* (Yarrison y col., 1972), *Bacillus subtilis* PCI 219 (Kimura y col., 1977), *Eurosta solidaginis* (Male y Storey,

1982), *Azospirillum brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) o *Bacteroides fragilis* (Yamamoto y col., 1987). En la Tabla 9 se muestran algunos valores de K_m para NAD-GDH de diversas fuentes, y en la Tabla 10 para NADP-GDH, incluyendo en ambos casos las de *H.halobium*.

Aunque es bien sabido que las constantes de Michaelis para los sustratos de las glutamato deshidrogenasas dependen principalmente de las condiciones de la reacción (Goldin y Frieden, 1971) los valores obtenidos para las enzimas de *H.halobium* son similares a los obtenidos para las enzimas de otras fuentes (Tablas 9 y 10), salvo en el caso del amonio para la NAD-dependiente, que fue excesivamente grande y podría estar relacionado con el carácter halofílico de la enzima de *H.halobium*. Kim y Fitt (1977), trabajando con alanina deshidrogenasa de *H.cutirubrum*, obtuvieron un valor de K_m de 0.8M para el amonio, y Keradjopoulos y Holldorf (1979) un valor de 0.6M con la misma enzima de *H.salinarium*. Comparando con la NADP-GDH de *H.halobium*, la afinidad de esta enzima por el sustrato amonio fue mucho mayor que la mostrada por la NAD-GDH. Este elevado valor de K_m para el amonio podría representar también una forma de control de la aminación y evitar la excesiva pérdida de 2-oxoglutarato (Bogoñez y col., 1985). Con la enzima NADP-dependiente, el valor de K_m para L-glutamato en la desaminación también fue muy elevado, por lo cual se podría decir que la NAD-GDH realiza un papel catabólico, mientras que la NADP-GDH está implicada en la biosíntesis del glutamato, como ocurre con la enzima de *L.laetevirens* (Bernard y Goas, 1979) o con la de *N.agilis* (Kumar y Nicholas, 1984). Las constantes de Michaelis para la dirección de aminación en la NADP-GDH son similares a las obtenidas para la enzima de *Halobacterium* del Mar Muerto (Leicht y col., 1978).

En el caso de la NADP-GDH de *L.laetevirens* (Bernard y Goas, 1979), con el sustrato amonio se obtuvo una representación doble inversa con una respuesta bifásica, que

TABLA 9

Valores de K_m para los sustratos de NAD-glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes.

FUENTE	2-KG	AMONIO	NADH	$\frac{K_m}{(mM)}$	NAD ⁺	L-GLU
<i>Fusarium</i> (Sanwal, 1961)	2.1	17.0	0.08		0.25	11.0
<i>Neurospora</i> (Sanwal y Lata, 1961)	4.6	17.0	0.55		0.33	5.5
<i>B. emersonii</i> (LéJohn y Jackson, 1968)	0.56	40.0	0.033		0.4	1.4
<i>Achlya</i> (LéJohn y Stevenson, 1970)	3.3	26.0	0.055		0.61	3.1
<i>Clostridium</i> SB ₄ (Winnacker y Barker, 1970)	0.65	0.32	0.1		0.01	1.8
<i>Modiolus demissus</i> (Reiss y col., 1977)	7.7	15.4	0.033		0.074	17.0
<i>Loligo pealeii</i> (Storey y col., 1978)	0.35	40.0	0.06		0.36	14.0
<i>B. fragilis</i> (Yamamoto y col., 1987)	7.1	4.9	0.20		3.0	7.3
<i>Phycomyces</i> (van Laere, 1988)	1.15	10.8	0.105		0.71	10.7
<i>H. halobium</i> (este Trabajo)	20.2	450	0.07		0.3	4.0

TABLA 10

Valores de K_m para los sustratos de NADP-glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes.

FUENTE	K_m (mM)					
	2-KG	AMONIO	NADPH	NADP ⁺	L-GLU	
<i>Neurospora</i> (Sanwal y Lata, 1961)	5.3	10.0	0.125	0.05	45.0	
<i>Fusarium</i> (Sanwal, 1961)	1.7	11.0	0.03	0.025	50.0	
<i>N. europaea</i> (Hooper y col., 1967)	4.3	16.1	0.049	0.0079	6.7	
<i>T. novellus</i> (LéJohn y col., 1968)	7.4	7.5	0.077	0.061	36.0	
Hígado pintarroja (Corman e Inamdar, 1970)	4.5	80.0	0.4	0.08	84.0	
<i>B. flavum</i> (Shio y Ozaki, 1970)	5.72	3.08	0.027	0.033	100	
<i>B. licheniformis</i> (Phibbs y Bernlohr, 1971)	6.7	5.5	0.12	--	39.0	
<i>N. crassa</i> (Blumenthal y Smith, 1973)	5.3	10.0	0.125	0.05	45.0	
<i>S. typhimurium</i> (Coulton y Kapoor, 1973b)	4.0	0.29	0.019	0.013	50.0	
<i>T. bacillus</i> (Epstein y Grossowicz, 1975)	1.3	21.0	0.053	0.3	11.0	
<i>E. coli</i> (Sakamoto y col., 1975)	0.64	1.1	0.04	0.042	1.3	
<i>S. cerevisiae</i> (Camardella y col., 1976)	0.4	10.0	0.028	0.12	10.0	
<i>M. seline</i> (Bishop y col., 1978)	0.55	65.0	0.024	0.014	9.2	
<i>B. megaterium</i> (Hämmila y Mäntsälä, 1978)	0.36	22.0	0.0087	--	--	
<i>Halobacterium</i> del Mar Muerto (Leicht y col., 1978)	3.0	16.6	0.024	0.061	14.2	

FUENTE (continuación)	K_m (mM)				
	2-KG	AMONIO	NADPH	NADP ⁺	L-GLU
<i>Lobaria laetevirens</i> (Bernard y Goas, 1979)	2.2	7.5Y71.4	0.028	0.059	11.8
<i>S.repens</i> (Botton y Msatef, 1983)	0.64	2.6Y21.2	0.049	0.043	5.5
<i>Pseudomonas</i> AM1 (Bellion y Tan, 1984)	0.76	20.2	0.033	--	31.6
<i>N.agilis</i> (Kumar y Nicholas, 1984)	3.6	6.3Y33	0.007Y0.1	--	--
<i>L.fermentum</i> (Misono y col., 1985)	5.6	6.76	0.0775	0.044	79.0
<i>Hyphomicrobium</i> X (Duchars y Attwood, 1987)	1.6	0.5Y3.3	0.015	--	10.2
<i>N.hamburgensis</i> (Weining y Nicholas, 1987)	5.0	9.0	0.013Y0.040	--	--
<i>B.fragilis</i> (Yamamoto y col., 1987)	0.14	1.7Y5.1	0.013	0.019	2.4
<i>H.halobium</i> (este estudio)	13.3	3.1	0.077	0.11	4600.0

se explica por una cooperatividad negativa del amonio en la formación del complejo enzima-sustrato. Esta curva bifásica también aparece para el amonio en la enzima de *Sphaerostilbe repens* (Botton y Msatef, 1983), que intentan explicar mediante la existencia de dos enzimas actuando con el mismo sustrato o de una sola enzima con dos formas diferentes. Este comportamiento también se obtiene con la enzima de *Nitrobacter agilis* (Kumar y Nicholas, 1984) para los sustratos NADPH y amonio, deduciendo que la reacción de aminación de NADP-GDH es estimulada por ambos sustratos. Esto probablemente está asociado con cambios en la agregación de la enzima (Smith y col., 1975), modificada en alguna etapa durante la purificación, más que con la presencia de dos enzimas NADP-dependientes distintas. En el caso de la GDH de *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) explicaron la naturaleza bifásica de la representación doble inversa para el amonio por la presencia de un centro de baja afinidad y otro de alta afinidad para NH_3 en la enzima. El centro de baja afinidad parece operar en la primera fase (con las concentraciones menores de amonio) y el de alta afinidad en la segunda fase. Con la enzima de *Hyphomicrobium X* (Duchars y Attwood, 1987) y el amonio también sucede algo similar, y su argumento es que puede deberse a una combinación entre la cooperatividad negativa y la cooperatividad positiva, o bien a un efecto del aumento de la fuerza iónica dentro de la cubeta. Este fenómeno no se ha observado con la enzima de *H.halobium*.

La enzima de *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) presentó una K_m para el L-glutamato, con NADP^+ como coenzima, dos órdenes de magnitud más elevada que la del 2-oxoglutarato, y por otro lado no se pudo obtener la reacción de desaminación oxidativa con NAD^+ como coenzima. Por estos dos motivos se pensó que la enzima catalizaba la aminación reductiva de 2-oxoglutarato; además, la actividad molecular de esta enzima es 3.3 veces más alta en la reacción de



aminación que de desaminación. La NADP-GDH de *E.coli* (Sakamoto y col., 1975) presentó una relación de valores de K_m del 2-oxoglutarato y L-glutamato de sólo dos veces, por lo que la reacción en este organismo no puede ser únicamente unidireccional. En *S.typhimurium*, la K_m para L-glutamato fue 12.5 veces la de 2-oxoglutarato y Coulton y Kapoor (1973b) concluyeron, a la vista de este resultado, que la reacción de glutamato deshidrogenasa *in vivo* era esencialmente unidireccional en favor de la biosíntesis de L-glutamato. En *H.halobium*, para la NAD-GDH estos valores de K_m sólo difieren en 5 veces y por tanto la reacción en este organismo no puede ser del todo unidireccional, sino que funcionaría tanto en el catabolismo de L-glutamato como en su biosíntesis. En cambio, para NADP-GDH de *H.halobium* la K_m para glutamato es 350 veces la de 2-oxoglutarato, lo que implicaría que la reacción catalizada por NADP-GDH sí es unidireccional, confirmando su papel en la biosíntesis del glutamato mencionada anteriormente.

4.2.5.- Peso molecular aparente.-

Los pesos moleculares de las enzimas activas se estimaron mediante filtración en gel de Sepharosa CL-6B en presencia de NaCl 4M. La principal suposición de las estimaciones del peso molecular fue que la sal no afectó a los pesos moleculares aparentes de los patrones utilizados en los experimentos de filtración en gel, con excepción de ferritina, que aparece en una posición de peso molecular de 220000 daltons que corresponde a la mitad del peso molecular. Esto puede representar formas disociadas de la proteína debido, probablemente, a las condiciones moderadas de desnaturalización en presencia de NaCl 4M. Haciendo esta suposición se construyó una recta relacionando K_{AV} y el peso molecular. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.14. De esta Figura se obtuvieron los siguientes valores:



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

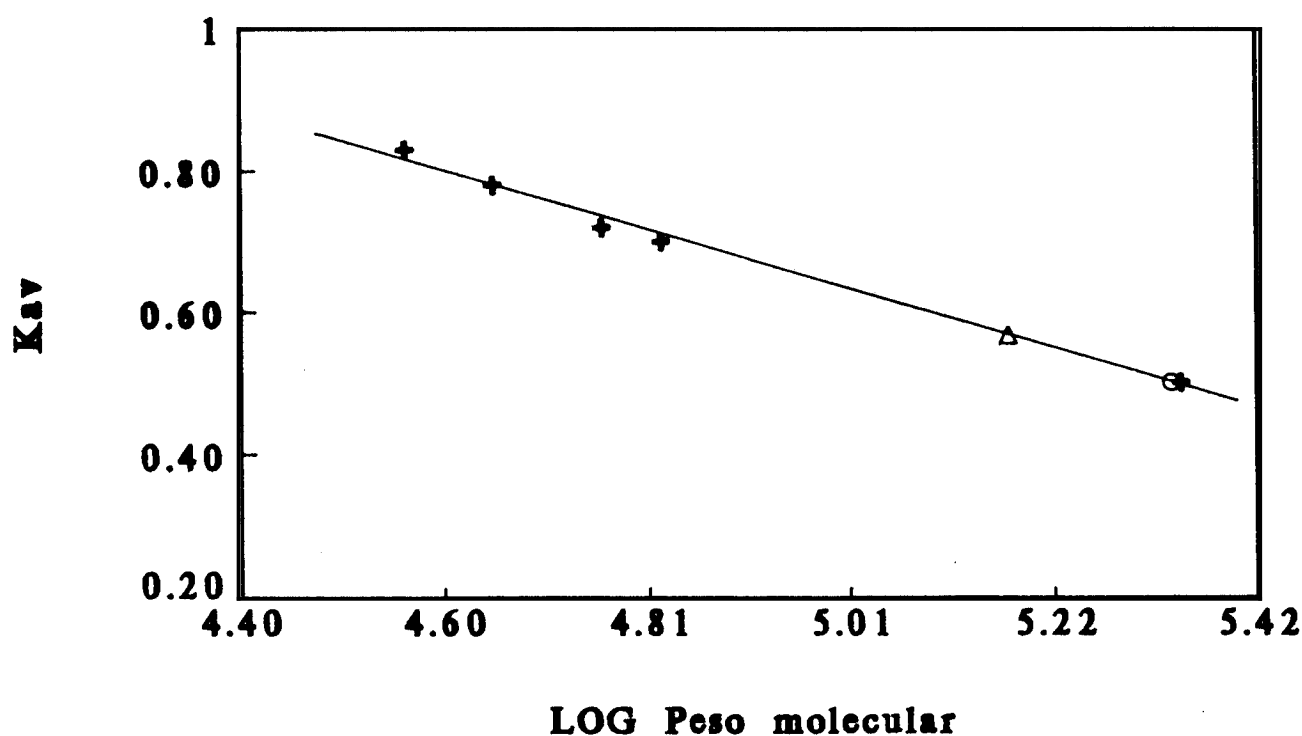


Figura 14 : Estimación del peso molecular aparente de las dos enzimas por elución en Sepharosa CL-6B. Las proteínas estándar fueron: β -lactoglobulina (36800), albúmina de huevo (45000) catalasa (57500, subunidad), albúmina de suero bobino (66000) y ferritina (220000). La NAD-GDH (Δ) presenta un peso molecular de 148000, y la NADP-GDH (o) de 215000.

148000 daltons para la enzima NAD-específica y 215000 daltons para la NADP-específica (Bonete y col., 1987). La NADP-GDH de *H.halobium* tuvo un peso molecular similar al de la enzima de *Halobacterium* del Mar Muerto, que fue de 213000 daltons (Leicht y col., 1978). En la Tabla 11 se pueden ver los valores de los pesos moleculares obtenidos para las glutamato deshidrogenasas de distintas fuentes, así como su referencia bibliográfica, permitiendo ver la escasez de datos referentes a GDHs de arqueobacterias. Generalmente, las GDHs presentan valores que van desde 250000 a 350000 daltons, margen obtenido tanto por tamizado molecular como por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o por equilibrio de sedimentación. Las dos enzimas de *H.halobium* tuvieron valores por debajo del rango de la generalidad, pero la NAD-GDH, que fue menor que la NADP-GDH, aún fue mayor que la enzima de *Phycomyces* (van Laere, 1988) (Tabla 11).

Louis y col. (1971) llevaron a cabo un estudio detallado de la filtración en gel y centrifugación con gradiente de densidad a fuerza iónica elevada con tres enzimas halófilas extremas, y concluyeron que la filtración en gel es un método válido para la determinación de los pesos moleculares aproximados de las proteínas halofílicas a concentraciones salinas donde son estables. Este método se utilizó para estimar pesos moleculares de proteínas halofílicas tales como isocitrato deshidrogenasa de *H.salinarium* (Aitken y Brown, 1972), aspartato transcarbamilasa (Norberg y col., 1973), citrato sintasa (Cazzulo, 1973), fosfatasa alcalina (Fitt y Peterkin, 1976; Fitt y Baddoo, 1979), alanina deshidrogenasa (Kim y Fitt, 1977) y piruvato quinasa (de Médicis y col., 1982) todas ellas de *H.cutirubrum*, así como NADH-deshidrogenasa de una bacteria halofílica (Hochstein y Dalton, 1973), proteasa de *H.halobium* (Izotova y col., 1983) y dihidroli-poamida deshidrogenasa de *H.halobium* y *H.volcanii* (Danson y col., 1984).

TABLA 11

Pesos moleculares de glutamato deshidrogenasas de diversas fuentes y métodos utilizados para su determinación.

FUENTE	METODO	P _m (daltons)
Hígado bovino (Frieden, 1962)	Equil. sedimentación	250000
Hígado pintarroja (Corman e Inamdar, 1970)	Equil. sedimentación	330000
Hígado de rata (King y Frieden, 1970)	Equil. sedimentación	350000
<i>Clostridium</i> SB ₄ (Winnacker y Barker, 1970)	Equil. sedimentación	275000
Hígado bovino (Cassman y Schachman, 1971)	Equil. sedimentación	320000
<i>N. crassa</i> (Blumenthal y Smith, 1973)	Equil. sedimentación	288400
<i>S. typhimurium</i> (Coulton y Kapoor, 1973a)	Filtración en gel	280000
<i>E. coli</i> (Sakamoto y col., 1975)	Equil. sedim. y filtr. en gel	300000
(Veronese y col., 1975)	Filtración en gel	245000
<i>B. subtilis</i> PCI 219 (Kimura y col., 1977)	Filtración en gel	250000
<i>Halobacterium</i> Mar Muerto (Leicht y col., 1978)	Equil. sedimentación	213000
<i>Loligo pealeii</i> (Storey y col., 1978)	Filtración en gel	310000
<i>E. solidaginis</i> (Male y Storey, 1982)	Filtración en gel	350000
<i>S. repens</i> (Botton y Msatef, 1983)	Electroforesis	280000

FUENTE (continuación)	METODO	P _m (daltons)
<i>A. xanthogrammica</i> (Male y Storey, 1983)	Filtración en gel	325000
<i>Pseudomonas</i> (Bellion y Tan, 1984)	Electroforesis	190000
<i>P. asaccharolyticus</i> (Hornby y Engel, 1984)	Filtr. en gel y ultracentrif.	266000
<i>L. fermentum</i> (Misono y col., 1985)	Filtración en gel	300000
<i>A. brasiliense</i> (Maulik y Ghosh, 1986)	Filtración en gel	285000
<i>Hyphomicrobium X</i> (Duchars y Attwood, 1987)	Electroforesis	380000
<i>N. hamburgensis</i> (Weining y Nicholas, 1987)	Filtración en gel	310000
<i>B. fragilis</i> (Yamamoto y col., 1987)	Filtración en gel	300000
<i>Phycomyces</i> (van Laere, 1988)	Filtración en gel	98000
<i>H. halobium</i> (este Estudio)	Filtración en gel	(NAD) 148000 (NADP) 215000

Al determinar los pesos moleculares de las dos actividades de *H. halobium* en estado nativo, se obtuvieron valores distintos. Por este motivo y teniendo en cuenta que presentan diferentes propiedades se pensó que las dos actividades no podían deberse a diferentes estados de agregación de una misma proteína: glutamato deshidrogenasa. Es sabido que las glutamato deshidrogenasas de diferentes fuentes varían mucho en su capacidad para polimerizar (por ejemplo, la polimerización de GDH bovina ocurre a concentraciones de proteína superiores a 0.1 mg/ml) (Smith y col., 1975), y además no se han encontrado polimerizaciones de glutamato deshidrogenasas de fuentes no animales. Por otra parte, cuando se realizó la dilución de NADP-GDH de *H. halobium* (16 µg/ml) o la concentración de NAD-GDH de *H. halobium* (>0.1 mg/ml) no se observó una conversión de una forma de enzima actuando preferencialmente con una coenzima a otra forma actuando con la otra coenzima. Para glutamato deshidrogenasa bovina, el ADP (que aumenta su actividad enzimática) favorece la agregación; pero para NAD-GDH de *H. halobium* los aminoácidos aumentan la actividad enzimática pero no favorecen la agregación, y la enzima no muestra actividad con NADP⁺ en presencia de aminoácidos. Por lo tanto, todo esto hizo llegar a la conclusión de que en *H. halobium* existen dos glutamato deshidrogenasas.

4.2.6.- Acción de efectores.

La glutamato deshidrogenasa de varias fuentes está regulada por una variedad de metabolitos (Smith y col., 1975). En base a esto se consideró interesante estudiar la interacción de ligandos, comúnmente reguladores, con las enzimas de *H. halobium*. Estos compuestos, incluidos unos en

el ciclo de los ácidos tricarbónicos y otros que están relacionados, se ensayaron a una concentración 5mM en la NAD-GDH y de 1mM en la NADP-GDH. Como se puede observar en la Tabla 12, el malato y el oxalacetato fueron los que produjeron un mayor porcentaje de inhibición en la reacción de desaminación catalizada por la NAD-GDH.

TABLA 12

Efecto de intermediarios metabólicos en la actividad de NAD-GDH de *H.halobium*, en ambas direcciones de reacción.

Inhibidor	Concentración (mM)	% Actividad Desaminación	residual Aminación
Citrato	5.0	75	-
Piruvato	5.0	75	-
Malato	5.0	51	7 3
Oxalacetato	5.0	34	6 1
PEP	5.0	92	-

La reacción de aminación fue inhibida en menor extensión por dichos compuestos. Los resultados obtenidos son similares a los mostrados por la NADP-GDH de *S.typhimurium* (Coulton y Kapoor, 1973b) y por NAD-GDH de *Bacillus subtilis* (Kimura y col., 1977) pero difieren de los resultados obtenidos con NAD-GDH de *Clostridium botulinum* (Hammer y Johnson, 1988), para la cual se obtienen mayores porcentajes de inhibición en la reacción de aminación de 2-oxoglutarato. Algunos de estos compuestos inhibidores son ácidos dicarbónicos, sugiriendo que la inhibición producida en la dirección de aminación pudiera deberse a similitudes estructurales con el 2-oxoglutarato. Por otra parte, la inhibición

en la desaminación oxidativa del glutamato podría reflejar un mecanismo de control de la NAD-GDH halofílica, sugiriendo que dado que se dispone de malato y oxalacetato para la obtención de energía, la desaminación del glutamato para producir 2-oxoglutarato fuese innecesaria.

Para la NADP-GDH en la reacción de aminación no se obtuvo ningún efecto con los metabolitos citados.

Se sabe que los nucleótidos de purina afectan a la actividad de la glutamato deshidrogenasa de procedencia animal (Smith y col., 1975). Con la GDH de hígado bovino y de hígado de pollo se produjo un aumento en la actividad de 4 veces y 10 veces, respectivamente, por la presencia de ADP (Goldin y Frieden, 1971). Se ensayó el modo de acción de estos compuestos en las glutamato deshidrogenasas de *Halobacterium halobium*, pero no afectaron a la actividad de la NADP-GDH de *H.halobium* cuando se ensayaron en un rango de concentraciones entre 1 y 10mM (Bonete y col., 1987). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Leicht y col. (1978) con NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto, sugiriendo dichos autores que esto podría indicar que la enzima no está sujeta a un comportamiento de asociación inducido por ligandos como lo está la GDH bovina (Eisenberg y col., 1976).

Para la NAD-GDH, en el sentido de desaminación, el ATP y el GTP (3.0 mM) mostraron porcentajes de inhibición del 28 y el 37%, respectivamente, mientras que en el sentido de aminación el AMP, ADP y GMP (3.0 mM) produjeron porcentajes de inhibición del 18, 18 y 25%, respectivamente. Cuando al medio de reacción se le añadió Mg^{+2} el efecto inhibitorio aumentó, dando valores del 47, 49 y 40%, respectivamente. Las glutamato deshidrogenasas de *N.europaea* (Hooper y col., 1967), *Clostridium* SB₄ (Winnacker y Barker, 1970) y *B.licheniformis* (Phibbs y Bernlohr, 1971) no resultaron afectadas por los nucleótidos de purina. En el caso de la

NAD-GDH de *Loligo pealeii* (Storey y col., 1978) el ADP fue un potente activador de la reacción de desaminación, llegando a un aumento de 100 veces en la actividad para una concentración 5mM de ADP. Además observaron que el ADP actuaba como inhibidor de la aminación del 2-oxoglutarato. La desaminación del glutamato catalizada por NAD-GDH de *Phycomyces* (van Laere, 1988) o por la enzima de *Rhodospirillum rubrum* (Bachofen y Neeracher, 1968) fue modulada negativamente por el ATP, produciendo un 40% de inhibición en la enzima de *Phycomyces*. Para la enzima de *Thiobacillus novellus* se observó que el ADP y el AMP eran efectores positivos de la desaminación del glutamato, mientras que estos nucleótidos eran efectores negativos y el ATP positivo para la aminación del 2-oxoglutarato (LéJohn, 1967; LéJohn y McCrea, 1968). Estos autores propusieron que el AMP y el ADP actuaban como efectores positivos y modulaban el comportamiento de la NAD-GDH de *T.novellus* de manera que resultara aumentada la degradación del glutamato.

Comparando los resultados obtenidos para la NAD-GDH de *H.halobium* con los de otros autores para la enzima de otras fuentes, se puede observar que son bastante similares en cuanto que el ATP es un efector negativo de la desaminación y positivo en la aminación, mientras que el ADP resulta ser negativo en la aminación y positivo en la desaminación. La modulación negativa por ADP y AMP podría sugerir que la reacción de aminación del 2-oxoglutarato en *H.halobium* está inhibida cuando el suministro de energía es bajo (es decir, niveles de ADP altos) y probablemente de esta forma la concentración de 2-oxoglutarato en el ciclo de Krebs pueda estar controlada, entre otras, por la actividad de la NAD-GDH. Usando la hipótesis de Atkinson (1960) podríamos decir que el papel principal de la enzima es el suministro de energía vía oxidación del glutamato, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que algunos halófilos metabolizan

aminoácidos en lugar de carbohidratos para la obtención de energía (Aitken y Brown, 1969).

Por último, una tercera clase de efectores fueron los aminoácidos. En experimentos previos (Camacho, 1984), glicina estimuló la actividad de la glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente de *Halobacterium halobium*. Estos resultados constituyeron la base para el estudio del efecto de los aminoácidos en la enzima NAD-GDH (Tabla 13). Como se puede apreciar, de los 17 L-aminoácidos ensayados, 13 fueron efectores positivos de la actividad, tanto en la aminación (Fig.15) como en la desaminación (Fig.16). Se intentó producir la reacción con aminoácido pero sin 2-oxoglutarato o glutamato, pero no dio resultado positivo.

Una observación interesante fue el efecto regulador que los aminoácidos produjeron en la actividad de GDH de *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986). Alanina, lisina, histidina y glutamato resultaron ser inhibidores competitivos de la aminación reductiva, NADP-dependiente, del 2-oxoglutarato. Los autores indicaron que en general los aminoácidos compiten con el 2-oxoglutarato por el centro de unión de sustrato. Alanina, histidina y lisina resultaron ser completamente inactivos como sustratos en la desaminación oxidativa, no pudiendo sustituir al glutamato. También observaron que la aminación reductiva dependiente de NADH era fuertemente inhibida por aminoácidos. Maulik y Ghosh (1986), a la vista de estos resultados, sugirieron que la síntesis de glutamato en la bacteria podía interrumpirse cuando la asimilación de amonio se hace innecesaria debido al alto contenido de aminoácidos en la célula. En la NADP-GDH de *B.flavum* (Shiio y Ozaki, 1970) ninguno de los aminoácidos ensayados mostró un efecto significativo en ambas direcciones de la reacción. Algo similar ocurrió con la NADP-GDH de *H.halobium*, la actividad no se vió afectada por la presencia de ningún L-aminoácido. En cambio la desaminación oxidativa del glutamato catalizada por la enzima de

TABLA 13

Efecto de algunos aminoácidos en las actividades de glutamato deshidrogenasa NAD-específica de *H. halobium*.

Aminoácido	Desaminación V_{aa}/V_0	Aminación V_{aa}/V_0
L-Metionina	2.8	18.6
L-Valina	3.7	16.5
L-Alanina	3.0	12.6
L-Leucina	2.8	12.3
L-Isoleucina	3.2	18.7
L-Lisina	1.4	1.9
L-Histidina	3.5	23.7
L-Arginina	1.0	1.0
Glicina	1.5	1.6
L-Acido aspártico	1.0	1.0
L-Cisteína	2.0	8.3
L-Prolina	1.0	1.0
L-Serina	1.0	1.0
L-Fenilalanina	4.1	17.4
L-Triptófano	1.9	15.5
L-Tirosina	2.7	12.2
L-Treonina	1.5	2.4

Todos los L-aminoácidos se utilizaron a una concentración 1mM excepto L-Tirosina que fue 1µM. Los tampones utilizados fueron: Tris-HCl 0.1M, pH 8.0, conteniendo NaCl 0.9M y AEDT 3.25 mM para la reacción de desaminación, y Tris-HCl 0.1M, pH 9.0, conteniendo NaCl 3.2M y AEDT 3.25mM para la reacción de aminación. Todos los ensayos se realizaron a 40°C.

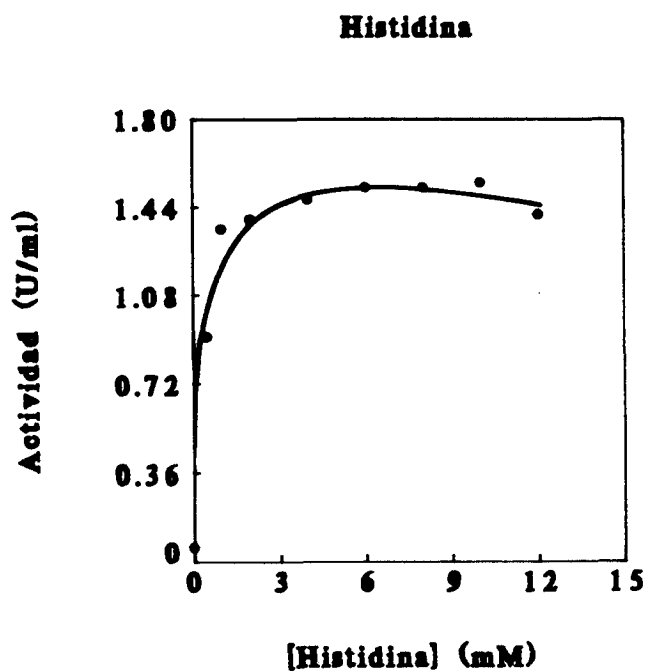
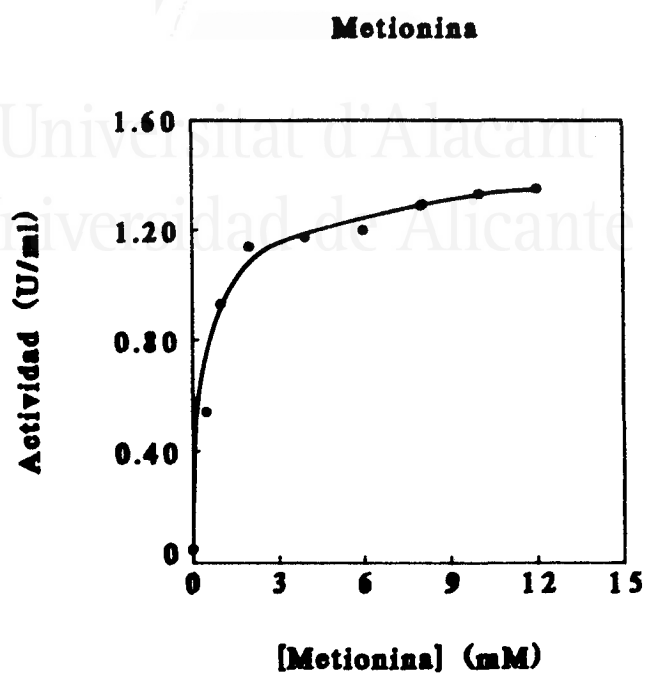
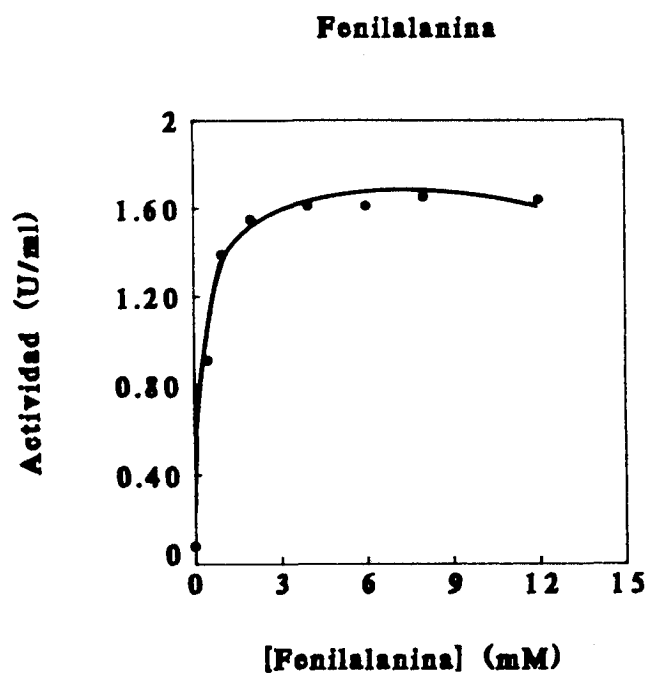


Figura 15 :

Efecto de la activación de NAD-GDH de *H.halobium* por L-aminoácidos en la aminación reductiva de 2-oxoglutarato. Se utilizó tampón Tris-HCl 0.1M pH 9.0 con NaCl 3.2M. El rango de concentración de los aminoácidos fué 0-12mM.

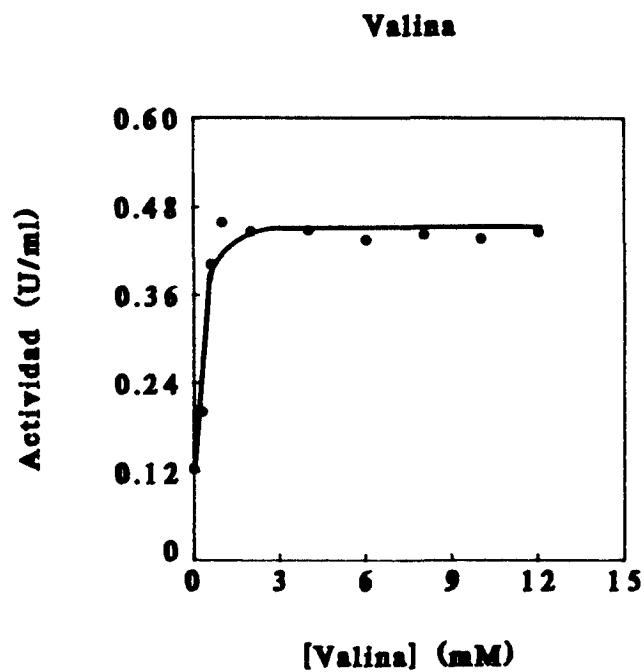
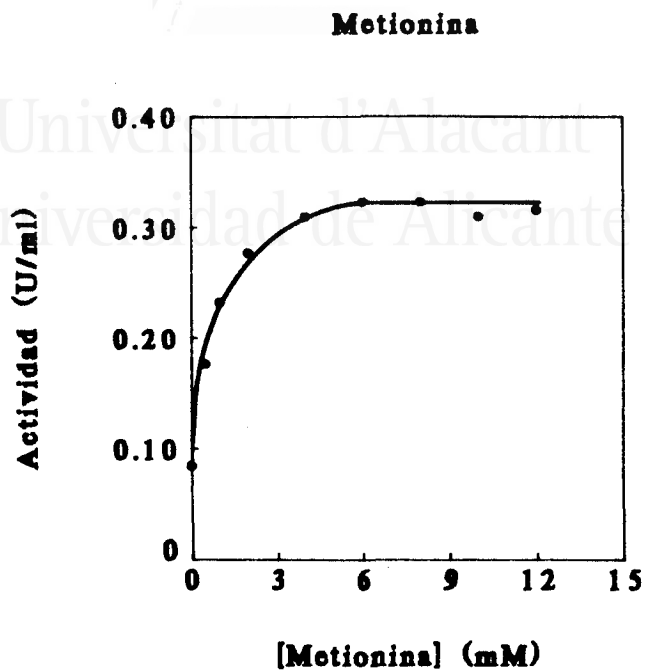
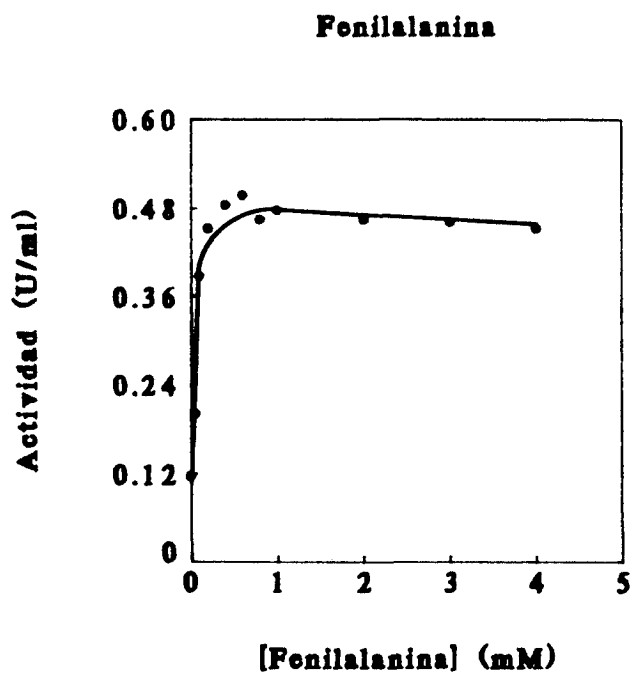


Figura 16 :

Efecto de la activación de NAD-GDH de *H.halobium* en la desaminación oxidativa de L-glutamato por L-aminoácidos. Tampón empleado: Tris-HCl 0.1M pH 8.0 conteniendo NaCl 0.9M. Rango de la concentración de L-aminoácido: 0-12mM.

hígado de vaca (Yielding y Tomkins, 1961) fue estimulada por leucina, metionina, isoleucina y norvalina, tanto si la enzima estaba en forma pura como si estaba en un extracto crudo. Los resultados de sus investigaciones indicaron que estos aminoácidos tenían un efecto pronunciado en la estructura de la GDH cristalina. Así, aparentemente, favorecen la agregación de las subunidades de la enzima, oponiéndose a los efectos de compuestos que causan su disgregación. Los autores explicaron el efecto de la L-leucina en la cinética de la enzima por su influencia en el estado de agregación de la proteína. Es interesante observar que ninguno de los aminoácidos naturales que influyen en la GDH de hígado de vaca pueden ser sintetizados por los mamíferos. Estos hechos condujeron a los autores a sugerir que dichos aminoácidos esenciales podrían regular el metabolismo general de aminoácidos.

Comparando los resultados anteriores con los obtenidos con la NAD-GDH halofílica se pueden observar algunas diferencias; así, mientras que la enzima de *A.brasilense* (Maulik y Ghosh, 1986) es inhibida por aminoácidos, la NAD-GDH halofílica resultó ser activada por los mismos aminoácidos que activaban a la GDH de hígado de vaca (Yielding y Tomkins, 1961), así como por algunos más. Por otra parte, la GDH halofílica también fue activada tanto si estaba purificada como si no. Como veremos posteriormente, cuando la enzima se sometió a un proceso de termoinactivación en presencia de aminoácidos resultó ser más estable frente a la temperatura que en su ausencia, llegando a la conclusión de que los aminoácidos podrían estabilizar la conformación más efectiva de la NAD-GDH de *Halobacterium halobium*. Estos hechos podrían reflejar la idea de que las arqueobacterias se asemejan más, en algunos aspectos, a los eucariotas que a las eubacterias (Lake y col., 1984, 1985).

Este efecto de activación por parte de los aminoácidos en la enzima de *H.halobium* podría estar relacionada con el

hecho de que los aminoácidos son importantes fuentes de energía en bacterias halófilas extremas (Larsen, 1962; Dundas, 1978), y algunos de los aminoácidos ensayados son esenciales para su crecimiento y otros son estimuladores (Onishi y col., 1965; Gibbons, 1969; Ducharme y col., 1972).

En vista a las razones de actividad, los valores de K_m y los resultados obtenidos con los efectores se podría concluir que *Halobacterium halobium* utiliza la enzima específica de NAD^+ como un mecanismo para generar 2-oxoglutarato y amonio, mientras que la específica de $NADP^+$ la utilizan para generar glutamato.

4.2.7.- Estabilidad de NAD-GDH y NADP-GDH frente a diversos parámetros.

4.2.7.1.- Estabilidad frente al pH.-

Se estudió el efecto del pH en la estabilidad de las dos enzimas glutamato deshidrogenasas de *H.halobium*. Para ello se incubaron muestras en un rango de pHs determinado. Al cabo de 10 minutos se volvieron a su pH inicial de 7.3 y se midieron las actividades residuales, obteniéndose los valores de la Figura 17. En estas Figuras se puede observar que NAD-GDH de *H.halobium* presentó su máxima estabilidad a pH 7.3, igual que NADP-GDH de *H.halobium*, no recuperando el 100% de la actividad, mostrada a pH 7.3, a ninguno de los pHs ensayados.

Estos datos indicaron que el almacenamiento de glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* a pH 7.3 fue el más apropiado, y confirmando la elevada estabilidad frente al tiempo de almacenamiento mostrada por la NADP-GDH.

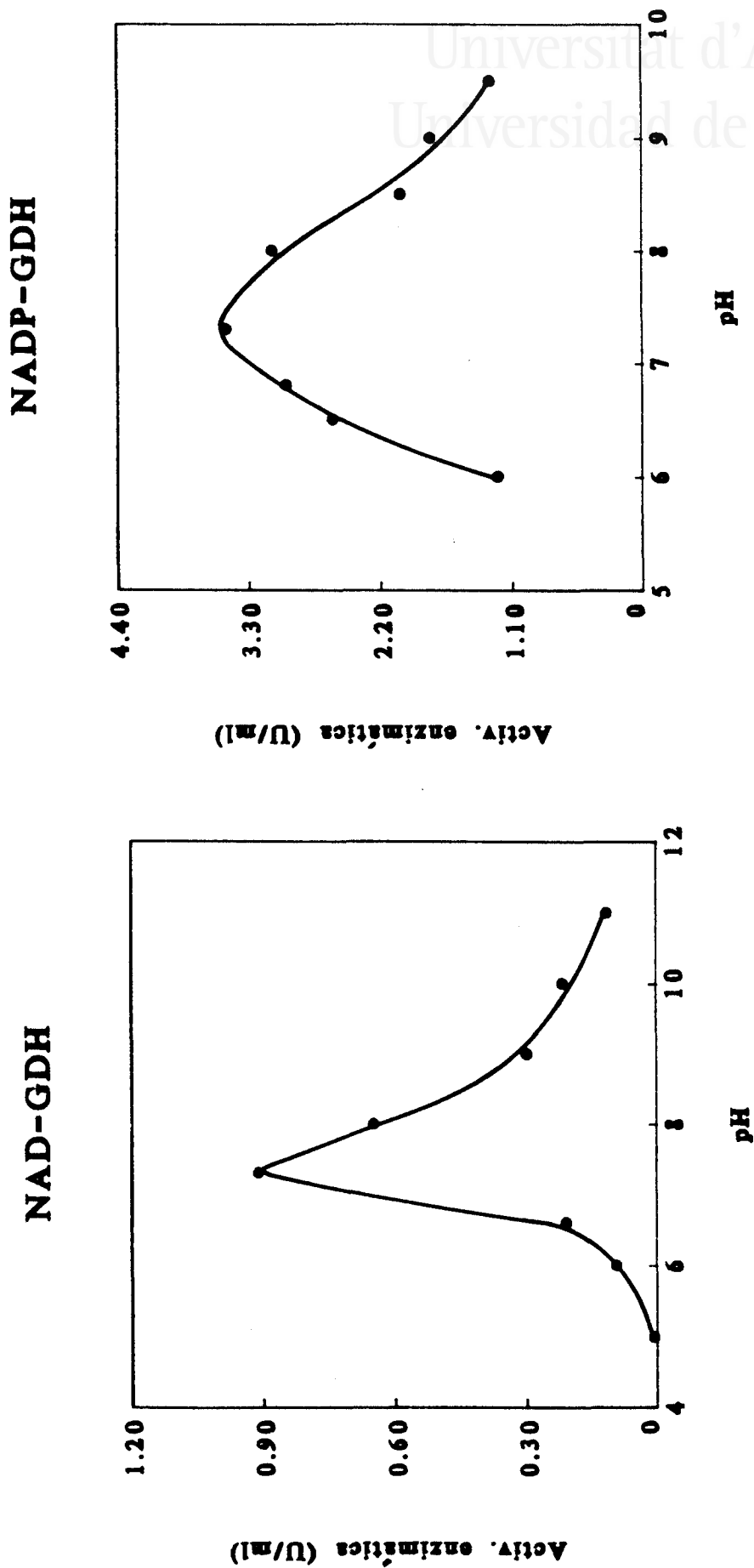


Figura 17 : Estabilidad de NAD-GDH y NADP-GDH de *H.halobium* frente al pH en ausencia de sustratos. Las actividades se determinaron en la dirección de aminación reductiva, a 40°C y en condiciones de ensayo estándar, después de 10 minutos de incubación.

4.2.7.2.- Estabilidad frente a la temperatura.-

Se realizó un estudio de la estabilidad de las dos GDHs halofílicas. La NAD-específica se incubó a varias temperaturas durante 5 min. en ausencia de sustratos, con tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M y determinando la actividad residual. La estabilidad se expresó como el % de la actividad original, manteniendo prácticamente el 100% de su actividad hasta 75°C (a esta temperatura aún mantuvo el 86%), conservando todavía a los 80°C un 50% de la actividad enzimática inicial, e incluso a 90°C quedó un 30% de dicha actividad (Fig. 18). Cuando esta enzima se incubó en presencia del aminoácido L-valina 5mM, la estabilidad se mantuvo hasta los 80°C y sólo se observó una pérdida del 50% de actividad cuando se llegó a los 90°C.

La NADP-específica retuvo el 92% de su actividad cuando se calentó a 65°C durante 5 minutos en ausencia de sus sustratos, y a 75°C fue completamente inactiva (Fig. 18). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por miembros del Departamento con otras enzimas halofílicas, tales como alanina deshidrogenasa de *H.halobium* que se mantuvo prácticamente constante hasta 75°C (Lucendo, 1986), lo mismo que malato deshidrogenasa de *H.halobium* (Cano, 1987), ambas dependientes de NAD⁺.

La NADP-GDH de *L.fermentum* (Misono y col., 1985) también fue estable durante 10 min. cuando se incubó a 70°C. Por otro lado, la temperatura de desnaturalización para la GDH de *N.crassa* (Sanwal y Lata, 1961; Blumenthal y Smith, 1973) (durante varios días en presencia de 2-oxoglutarato) fue de 50°C; las GDHs de *T.novellus* (LéJohn y McCrea, 1968) (durante 3 min.) estuvieron alrededor de los 65°C; la de *S.typhimurium* (Coulton y Kapoor, 1973a) (durante 5 min.) a los 55°C; la GDH NADP-dependiente de *E.coli* (Veronese y



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

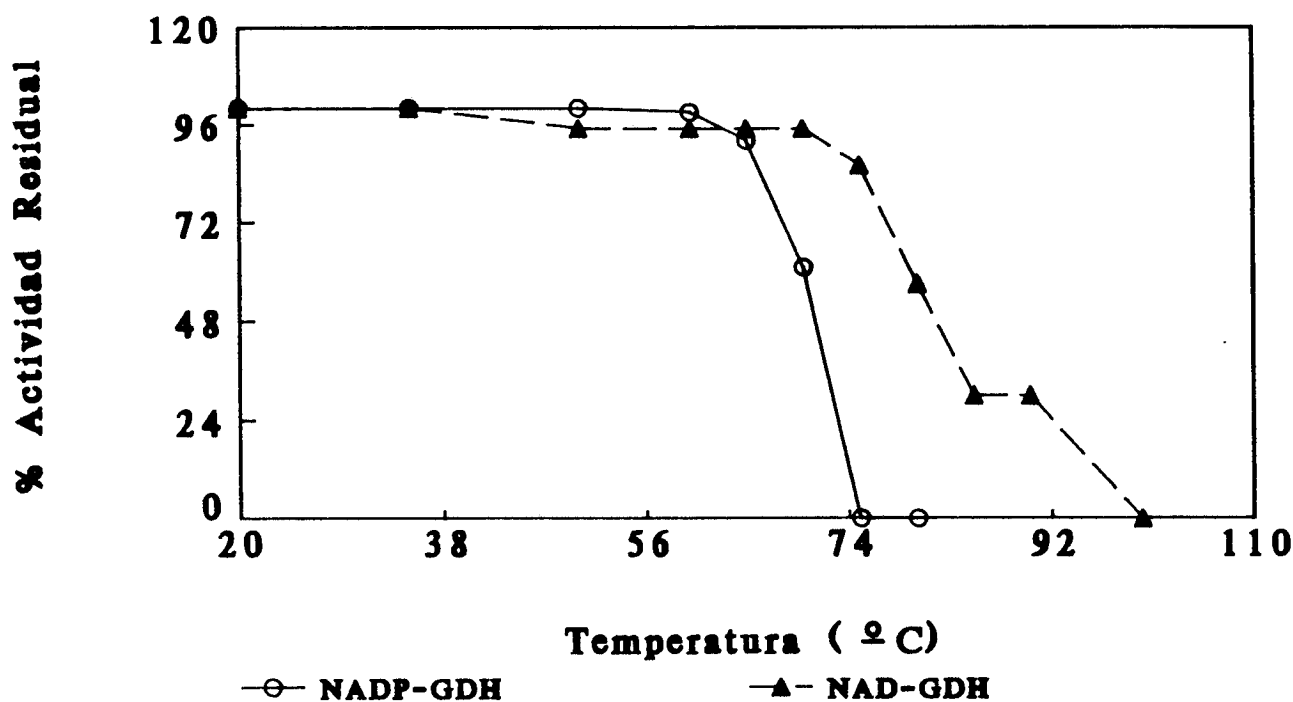


Figura 18 : Inactivación térmica de las dos glutamato deshidrogenasas de *H.halobium*. Las enzimas se calentaron a la temperatura indicada, manteniéndolas a esa temperatura durante 5 minutos, y enfriéndolas después a 5°C en un baño de hielo antes de medir la actividad.

col., 1975) (durante 10 min.), a los 60°C; y la de *Proteus inconstans* (Shimizu y col., 1979) (durante 20 min.), a 40°C. A la vista de todos estos datos se podría decir que la enzima NAD-dependiente de *H.halobium* es una de las más termoestables, prácticamente en condiciones similares a las citadas.

La NADP-GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto (Leicht y col., 1978) fue estable en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (4.3M) hasta 65°C, mostrando una vida media de 11 horas, aproximadamente. En las mismas condiciones, es decir, 65°C y NaCl 4M, las GDHs de *Halobacterium halobium* presentaron los siguientes valores:

- NAD-GDH, al cabo de 11 horas, retuvo un 62% de actividad, mientras que para la NADP-GDH fue del 48%.

- Las vidas medias fueron de 10 horas para la NADP-GDH, valor similar al obtenido para la enzima de *Halobacterium* del Mar Muerto, y de 17 horas para la NAD-GDH. Estos valores indican, como se expresaba anteriormente, que la NAD-GDH es más termoestable.

4.2.7.3.- Estabilidad frente a la concentración salina.

Para expresar cuantitativamente la estabilización de las dos glutamato deshidrogenasas de *H.halobium* por sales se midieron las velocidades de inactivación en el rango más bajo de concentración salina. Con este fin, las enzimas se incubaron a temperatura ambiente en soluciones de NaCl tamponadas con fosfato sódico 0.1M a pH 7.3. A intervalos de tiempo determinados, entre 0-60 minutos para la NAD-GDH y entre 0-120 minutos para la NADP-GDH, se recogieron

alícuotas y se midió inmediatamente su actividad en condiciones estándar, comparándola con la muestra de referencia de la enzima halofílica en condiciones óptimas de concentración salina (4M). Los resultados obtenidos, expresados como porcentajes de actividad residual en función del tiempo de inactivación se muestran en la Fig.19 para la NAD-GDH y los correspondientes a la NADP-GDH en la Fig.20. En ambos casos, las enzimas halofílicas se inactivaron más rápidamente cuanto más disminuyó la concentración salina, al igual que ocurre para otras enzimas halofílicas (Holmes y col., 1965; Larsen, 1967; Kushner, 1968). Según se puede observar en la Fig.19, al cabo de 17 minutos, a una concentración de 2M se mantuvo el 87% de actividad de la NAD-GDH, mientras que a 0.5M el porcentaje de actividad disminuyó hasta un 32%; al cabo de 60 minutos todavía quedó un 75% de actividad en presencia de 2M de NaCl.

Respecto a la NADP-GDH halofílica, al cabo de 24 minutos se mantuvo el 87% de la actividad para una concentración de NaCl de 1M, mientras que a 0.5M este porcentaje pasó a ser del 34%; quedando el 80% de actividad en presencia de 1M de NaCl al cabo de 90 minutos. Para la concentración de NaCl más baja ensayada (0.5M), prácticamente fueron iguales una enzima y otra, pero ya a 1M, la NAD-GDH, al cabo de 24 min. conservó el 47% de actividad, mientras que la NADP-GDH mantuvo el 85%, llegando a la conclusión de que ésta es mucho más estable que la primera, apoyándose también en el hecho de que a 1.6M de sal la NADP-GDH mantuvo un 62% de actividad después de siete días, mientras que la NAD-GDH sólo conservó un 29% de actividad al cabo de ese mismo tiempo. Similarmente, la treonina desaminasa de *H.cutirubrum* (Lieberman y Lanyi, 1972) se inactiva más rápidamente cuanto más disminuye la concentración salina, pero llegando al extremo de que a 0.5M de NaCl la enzima tiene una vida media menor de 60 segundos y en cambio a 5M tiene un valor aproximado de 5 días.

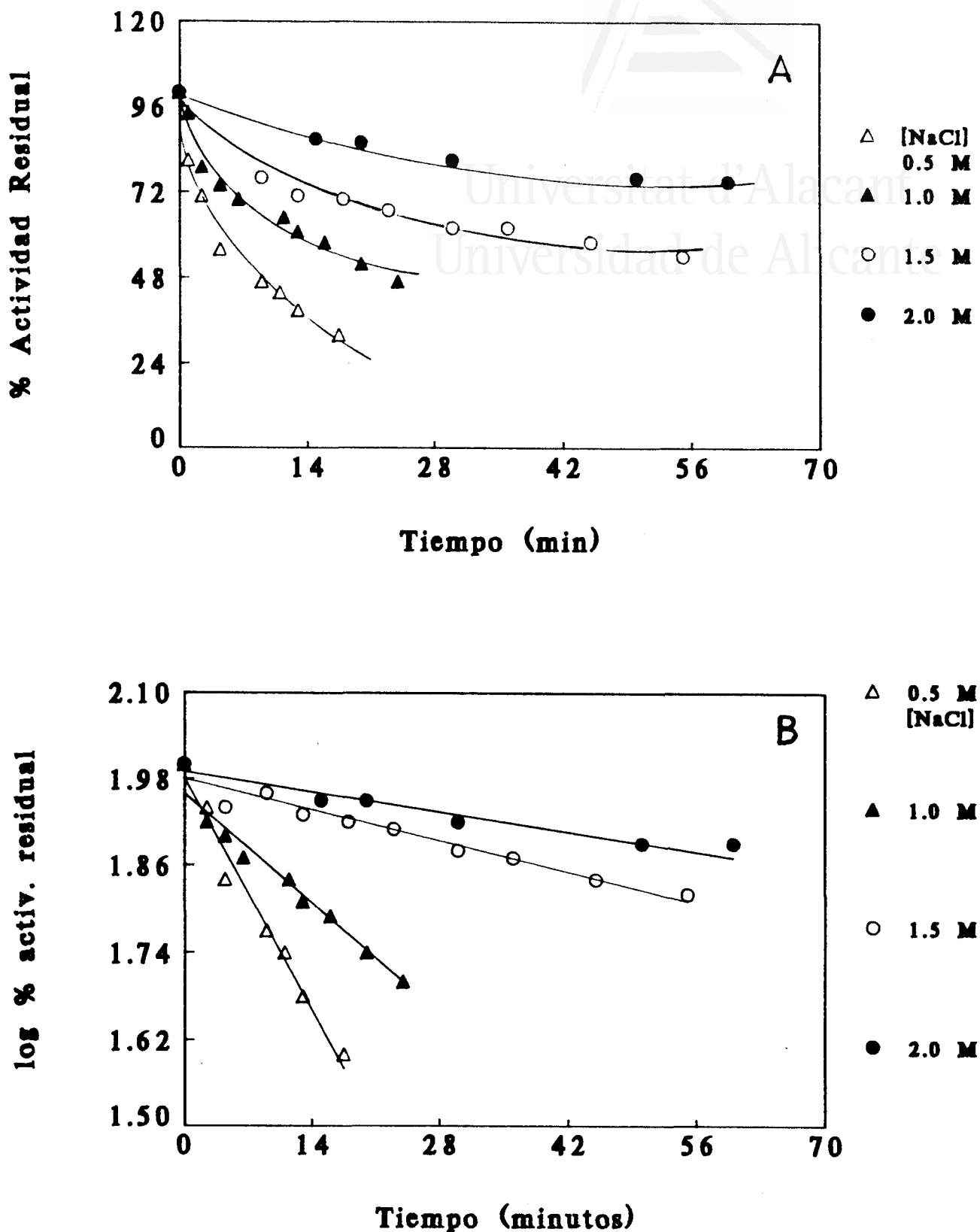


Figura 19 : A: Inactivación de NAD-glutamato deshidrogenasa de *H. halobium* a bajas concentraciones de NaCl: de 0.5M a 2.0M. La inactivación se llevó a cabo por dilución del tampón que contenía a la enzima con tampón sin sales. B: Cinéticas de inactivación de 1º orden para NAD-GDH halofílica a las mismas concentraciones de NaCl.

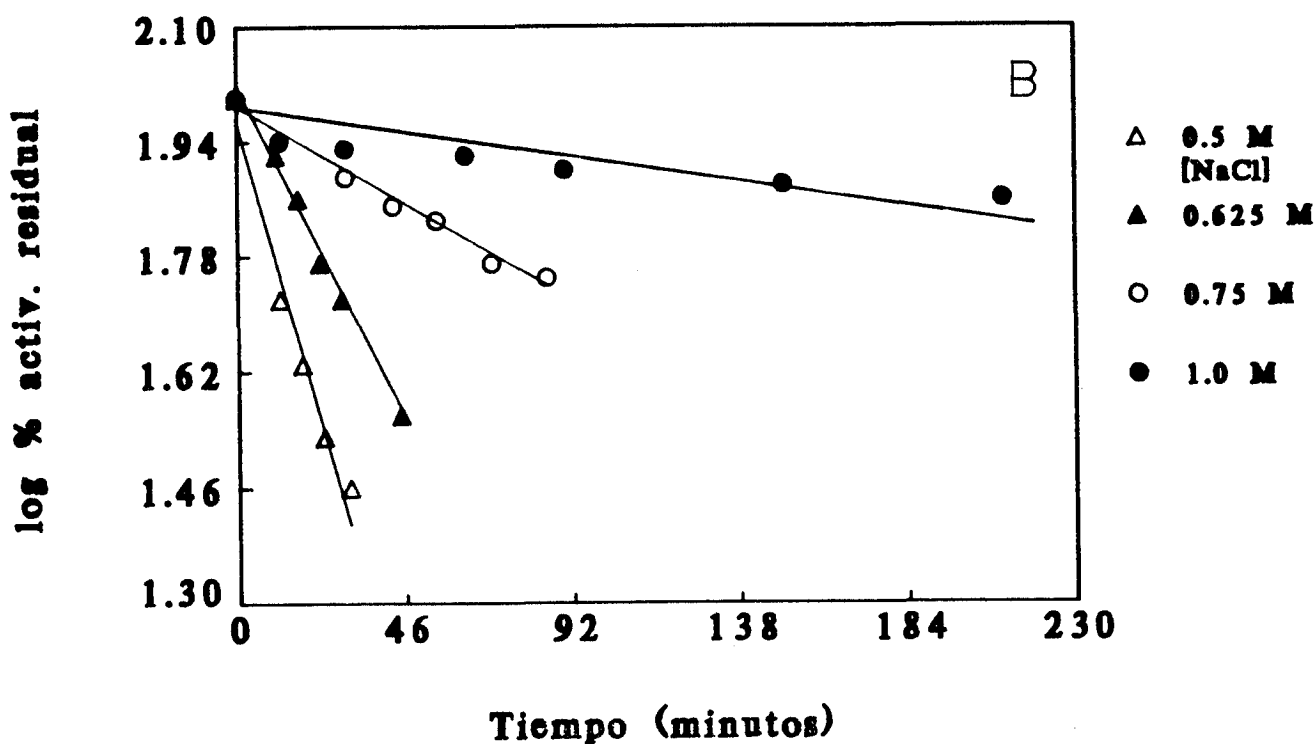
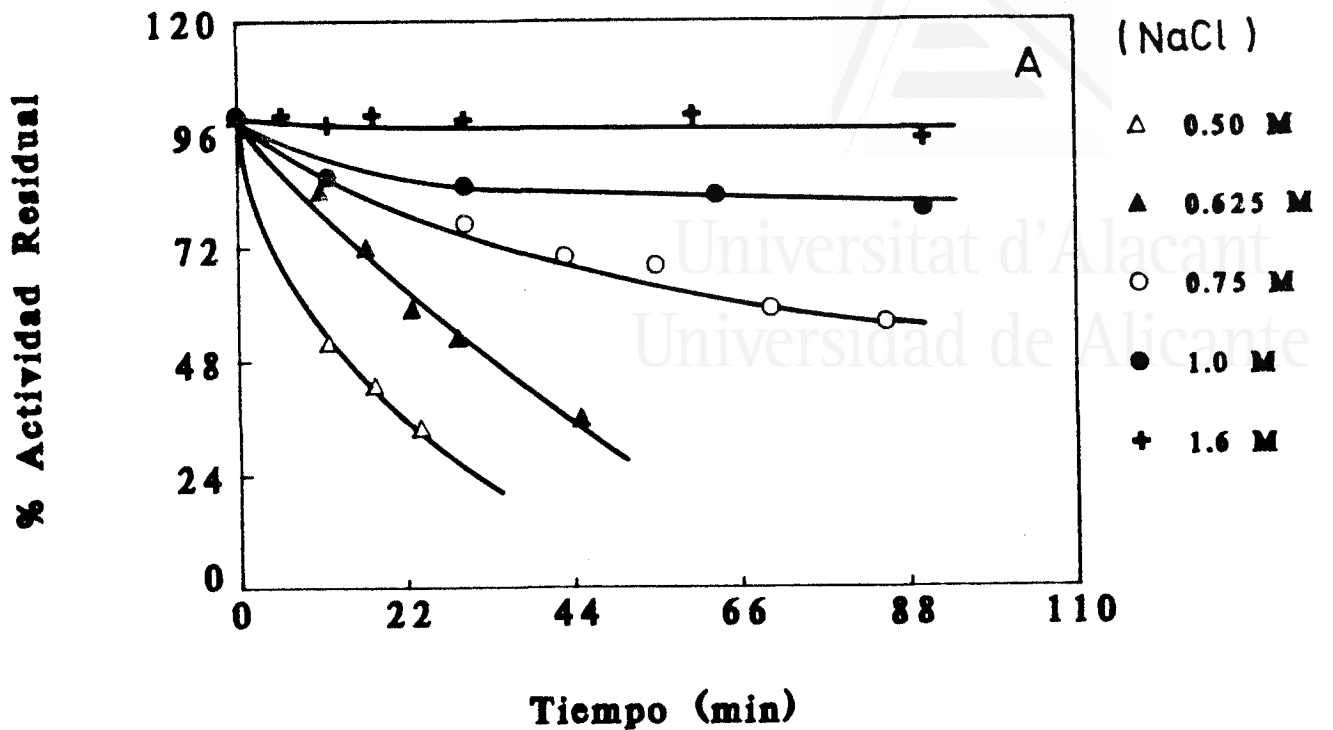


Figura 20 : A: Inactivación de NADP-glutamato deshidrogenasa de *H. halobium* a bajas concentraciones de NaCl: de 0.5M a 1.6M. La inactivación se llevó a cabo por dilución del tampón que contenía a la enzima con tampón sin sales. B: Cinéticas de inactivación de 1º orden para NADP-GDH halofílica a concentraciones de NaCl desde 0.5M a 1.0M.

La representación del logaritmo de la actividad enzimática residual frente al tiempo de exposición a distintas concentraciones de NaCl dieron líneas rectas para las dos enzimas (Fig. 19B y 20B), indicando que la inactivación puede describirse por medio de cinéticas de primer orden (Lanyi, 1969).

La protección contra la inactivación de enzimas por medio de sustancias capaces de reaccionar reversiblemente con ellas (en este caso, las sales) se puede calcular mediante una ecuación característica (Baxter, 1959; Holmes y Halvorson, 1965): $\log k_p = \log k - n \log [P]$, donde k es la constante de velocidad de inactivación de la enzima en ausencia de sustancia protectora, k_p es la constante en presencia de protector P , " n " es el número de moles de protector reaccionando con un mol de enzima para dar la forma protegida, y K es la inversa de la constante de equilibrio para la reacción. La representación del logaritmo de la constante de velocidad de inactivación de primer orden frente al logaritmo de la concentración salina da una recta como las que se muestran en la Fig. 21 para la NAD-GDH y NADP-GDH de *H.halobium*. La linealidad de estas representaciones secundarias es indicativa de la participación de interacciones hidrofóbicas en la estabilización de la estructura nativa de estas enzimas (Mevarech y Neumann, 1977). Baxter (1959) encontró un valor de " n " entre 2 y 3 para NaCl y lactato deshidrogenasa de *H.salinarium*; Aitken y col. (1970) calcularon los correspondientes a isocitrato deshidrogenasa de *H.salinarium* que fueron 3.6 y 2.9 para NaCl y KCl, respectivamente, y Lanyi (1969) encontró un valor de 2.4 para NaCl y menadiona reductasa de *H.cutirubrum*. Para glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente de *H.halobium* el número de moles de NaCl encontrado fue de 1.9, y para la NADP-dependiente, de 5.6. El valor correspondiente a la NAD-GDH fue algo menor que los obtenidos por los otros autores con las otras enzimas, pero el calculado para la NADP-GDH es

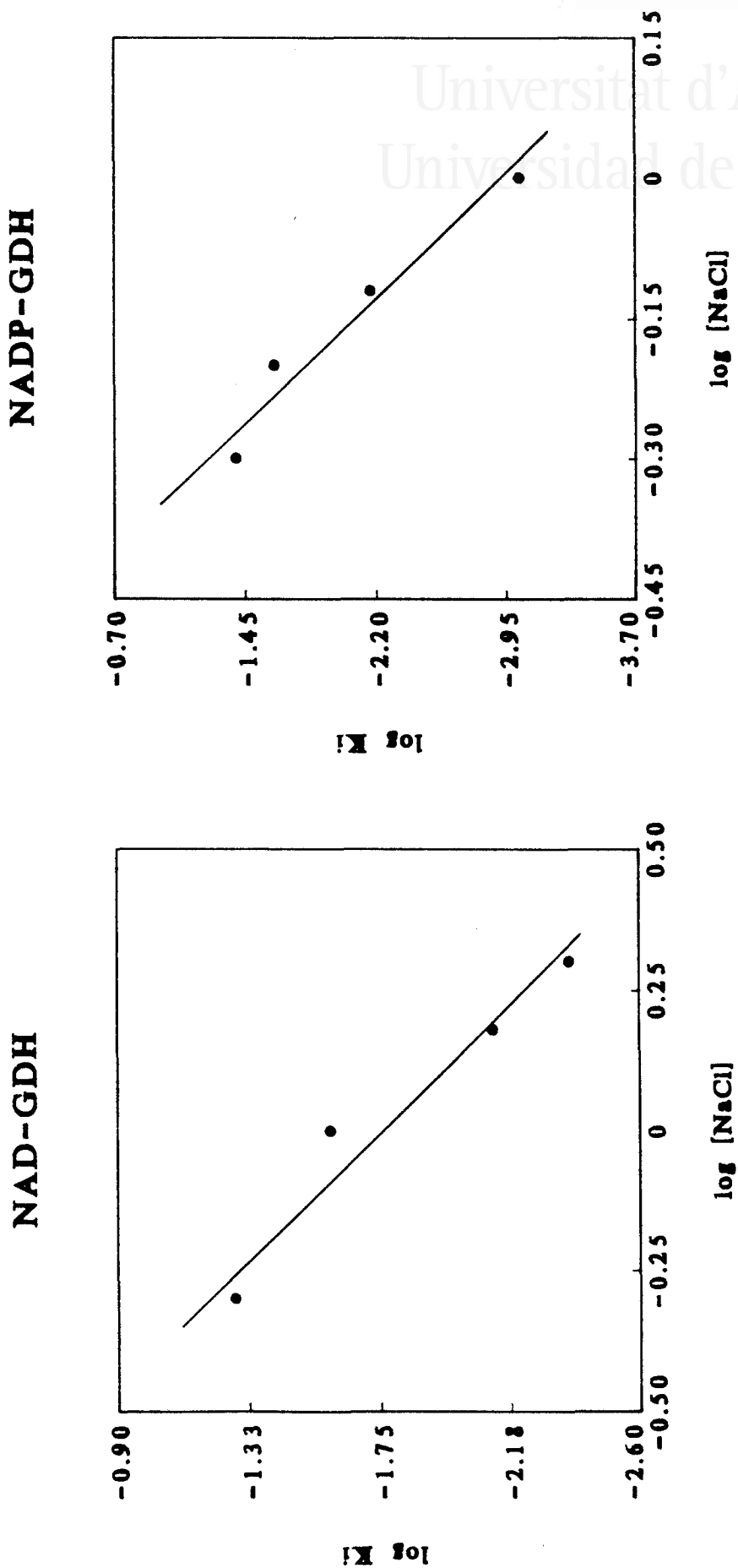


Figura 21 : Influencia del NaCl en la velocidad de inactivación de ambas enzimas de H.halobium. La pendiente representa el número de moles de sal necesarios para proteger la enzima.

similar al obtenido por Holmes y Halvorson (1965) para NaCl y malato deshidrogenasa de *H. salinarium*, que fue de 4.5. Aunque hay autores (Aitken y col., 1970) que piensan que la pendiente de una representación de este tipo no es una indicación válida del número de centros de unión de un ligando a la proteína, probablemente, la única conclusión, no definitiva, que se puede sacar de estas representaciones es que la NAD-GDH requiere al menos 2 moles de NaCl y la NADP-GDH 6 moles para su estabilización bajo condiciones experimentales. Ya que el efecto protector de las sales no parece ser específico (Baxter, 1959), es probable que se pueda encontrar una explicación en términos de efectos iónicos generales en la proteína enzimática. Como las proteínas están compuestas por moléculas flexibles con numerosos grupos cargados, cualquier efecto en las interacciones mutuas de estas cargas puede influir en el tamaño y forma de las moléculas de proteína (Baxter, 1959).

En particular, el exceso de cargas positivas o negativas que las moléculas llevan (excepto en el punto isoeléctrico) tenderán a repelerse mutuamente. Ya que la desnaturalización, generalmente, se cree que implica un desplegamiento de las cadenas polipeptídicas, cuanto mayor sean las repulsiones electrostáticas internas mayor será la tendencia de la proteína a sufrir desnaturalización. De acuerdo con la teoría de Debye and Hückell, la presencia de sales tenderá a reducir los efectos electrostáticos y así disminuye la probabilidad de desnaturalización.

La composición de aminoácidos de proteínas halofílicas presenta un aumento en la cantidad de residuos aspártico y glutámico con respecto a sus contrapartidas no halofílicas (Lanyi, 1974). También se observa, a partir de la comparación de la composición de las proteínas ribosómicas, que hay una disminución de frecuencia de aminoácidos hidrofóbicos frontera como serina y treonina. Esta observación y otras han sugerido tres modos principales de estabilización

de proteínas halofílicas: 1) un apantallamiento de cargas de la molécula inducido por el número excesivo de residuos acídicos y efectivo después de la adición de, al menos, 0.5-1M de sal (Baxter, 1959; Soo-Hoo y Brown, 1967; Lanyi, 1974), 2) el empaquetamiento próximo de grupos hidrofóbicos no polares inducidos por concentraciones salinas más elevadas (Lanyi, 1974, 1979), y 3) mantenimiento de la superficie hidratada de la proteína a través de la utilización de los grupos carboxilo de glutamatos y aspartatos (Werber y col., 1978; Pundak y Eisenberg, 1981a,b). En el caso de NAD-GDH y NADP-GDH de *H.halobium* podría ser ésta la explicación del número de moles que se necesitan en ambas enzimas, pero no está claro, porque Pundak y col. (1981) demostraron que MDH y GDH halofílicas obtienen niveles de hidratación normales en el desplegamiento. Estos autores creen poco probable que las interacciones hidrofóbicas desempeñen un papel importante en la estabilización de proteínas halofílicas, y han sugerido que estas proteínas halofílicas resistirían la compactación interna en presencia de sales fuertemente hidratadas, reduciendo considerablemente su volumen interno.

Tanto la enzima NAD-dependiente de *H.halobium* como la NADP-dependiente tuvieron una necesidad absoluta de la presencia de elevada fuerza iónica para su estabilidad; la diálisis de las enzimas frente a tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 (libre de sales) durante 24 horas las llevó a una pérdida completa de actividad, como ocurrió con otras enzimas halofílicas (Kim y Fitt, 1977; Leicht y col., 1978), y mediante una nueva diálisis frente al mismo tampón pero en presencia de NaCl 4M no se logró recuperar ninguna de las dos actividades. Por el contrario, la citrato sintasa de *H.cutirubrum* (Higa y Cazzulo, 1975) presentó una inactivación reversible recuperando entre el 50 y el 70% de la actividad original cuando se sometió a diálisis frente a tampón con sales. Con alanina deshidrogenasa de *H.salinarium*, Keradjopoulos y Holldorf (1979) obtuvieron una

reactivación total utilizando el mismo método; también la malato deshidrogenasa de *H.cutirubrum* (Holmes y Halvorson, 1965) recuperó el 60% de la actividad original y la isocitrato deshidrogenasa de la misma fuente (Hubbard y Miller, 1972) se reactivó un 75% bajo condiciones óptimas. Las dos enzimas objeto de este Trabajo tuvieron un comportamiento, respecto a la inactivación, similar al obtenido por Leicht y col. (1978) para la GDH de *Halobacterium* del Mar Muerto, no pudiéndose encontrar condiciones para devolverles la actividad original.

En la Tabla 14 se muestran los valores de los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) y de las constantes de inactivación para a) la NAD-GDH y b) la NADP-GDH de *H.halobium* a las distintas concentraciones de sales. Como se puede observar, la vida media disminuye al disminuir la concentración de NaCl. Lo mismo le ocurre a la málico deshidrogenasa de *H.salinarium* (Holmes y Halvorson, 1963), llegando a un valor aproximado de 30 segundos para una concentración de 0.33M de NaCl. Pundak y Eisenberg (1981b) obtuvieron el valor de $t_{1/2}$ para malato deshidrogenasa de *Halobacterium* del Mar Muerto, siendo de 28 horas para una concentración de NaCl de 1.25M, valor mucho más elevado que los obtenidos para las dos GDHs de *H.halobium*.

4.2.7.4.- Estabilidad frente al tiempo de almacenamiento.

Con el fin de obtener las mejores condiciones de almacenamiento de las dos enzimas glutamato deshidrogenasa de *H.halobium*, en caso de no poder utilizarlas en el momento de su obtención, se estudió su estabilidad frente al tiempo de almacenamiento.

TABLA 14

Valores de vida media ($t_{1/2}$) y de las constantes de disociación de primer orden (K_1) para la inactivación de NAD-GDH y NADP-GDH de *Halobacterium halobium* al disminuir la concentración salina.

NAD-glutamato deshidrogenasa		NADP-glutamato deshidrogenasa	
[NaCl] (M)	K_1 (min^{-1})	[NaCl] (M)	K_1 (min^{-1})
0.5	0.052	0.500	0.040
1.0	0.026	0.625	0.024
1.5	0.0075	0.750	0.0068
2.0	0.0043	1.000	0.00094

NAD-glutamato deshidrogenasa		NADP-glutamato deshidrogenasa	
[NaCl] (M)	$t_{1/2}$ (min.)	[NaCl] (M)	$t_{1/2}$ (min.)
0.5	13.3	0.500	17.3
1.0	26.7	0.625	28.9
1.5	92.4	0.750	101.9
2.0	161.2	1.000	737.2



Se observó que a 80°C y en presencia de tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.3 con NaCl 4M, la NAD-GDH perdía un 38% de actividad a las 24 horas (Camacho, 1984), pero a temperatura ambiente fue bastante estable, manteniendo un 50% de su actividad enzimática al cabo de cinco meses; la NADPH, por su parte, en las mismas condiciones de almacenamiento y a temperatura ambiente, mantuvo un 83% de su actividad al cabo de dos años.

4.2.8.- Efecto de la disminución de la concentración salina en el espectro de fluorescencia.

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la estructura, la dinámica y la conformación de una proteína (Perozzo y col., 1988). El plegamiento de una cadena polipeptídica para formar una proteína globular compacta da como resultado que ciertos residuos de aminoácidos se encuentren ocultos del entorno acuoso (Hinman y col., 1974) y otros se sitúen en la superficie expuestos al disolvente polar (Eftink y Ghiron, 1976). Las proteínas en disolución no son estructuras perfectamente rígidas; ciertas regiones de la proteína pueden ser bastante flexibles. Un residuo que esté oculto puede llegar ocasionalmente a exponerse como resultado de fluctuaciones conformacionales de la proteína, por lo que los cambios estructurales en las proteínas producen cambios en el rendimiento de la fluorescencia y en la posición de la banda (Teale, 1960).

En los análisis de macromoléculas por fluorescencia se utilizan dos tipos de compuestos fluorescentes: los intrínsecos (presentes en la propia macromolécula) y los

extrínsecos (añadidos al sistema). En las proteínas existen sólo tres compuestos fluorescentes intrínsecos: el triptófano, la tirosina y la fenilalanina.

La fluorescencia natural de las proteínas está dominada normalmente por la contribución de los residuos de triptófano (Teale, 1960). Sin embargo, los residuos de triptófano en una proteína no necesariamente dan la misma fluorescencia, por lo que es útil aislar la emisión de los triptófanos individuales, si es posible. Por esto, todas las medidas de los parámetros de fluorescencia se deben realizar a longitudes de onda de excitación de 290-295 nm que es, en el rango espectral, donde únicamente se excita la fluorescencia del triptofanilo. En la literatura, desafortunadamente, la mayoría de los datos se obtienen a una excitación de 280 nm, y el espectro de fluorescencia contiene un componente de tirosina más o menos significativo (Burstein y col., 1973).

El triptófano emite a longitudes de onda más cortas en la proteína completamente plegada que en la proteína desnaturalizada (Formoso y Forster, 1975). La longitud de onda de máxima fluorescencia de los residuos triptofanilos en proteínas nativas va desde 325 a 350 nm. A menudo se ha especulado sobre la posibilidad de que haya una relación entre la longitud de onda de máxima fluorescencia y la exposición de triptófanos en una proteína (Teale, 1960). Esto está basado en el hecho de que las proteínas desnaturalizadas y desplegadas tienen una emisión al rojo (≈ 350 nm), y que en disolventes de baja constante dieléctrica, tales como dioxano, la longitud de onda del indol varía al azul (≈ 320 nm) (Eftink y Ghiron, 1976).

Podría esperarse que la fluorescencia del triptófano se excitara con la luz absorbida por fenilalanina y tirosina. De hecho, la fluorescencia de fenilalanina no se detectó en presencia de otros residuos aromáticos, y aquellas proteínas que contenían triptófano mostraron exclusivamente la

fluorescencia de este residuo, independientemente del contenido de residuos de tirosina (Cowgill, 1967). La fluorescencia de tirosina se detectó con bajo rendimiento con un máximo de banda a 304 nm sólo en ausencia de triptófano. Las proteínas que contenían tirosina, pero no triptófano, mostraron fluorescencia de tirosina con bajo rendimiento, o no fueron fluorescentes (Teale, 1960).

Todo proceso de inactivación está acompañado por cambios en el espectro de fluorescencia (Mevarech y col., 1977), por lo cual el estudio de la inactivación de las enzimas halofílicas por disminución de la concentración salina, expuesto anteriormente, se completó con los espectros de fluorescencia correspondientes.

Forma activa.- En la Fig. 22 se muestran los espectros de emisión obtenidos para NAD-GDH y NADP-GDH de *H.halobium*, en tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.3 conteniendo NaCl 4M, excitando a una longitud de onda de 295 nm. El máximo de fluorescencia se obtuvo a 332 nm para la NAD-GDH y a 331 nm para la NADP-GDH. Dichos valores son atribuibles a la emisión de los residuos triptofanilo, tanto por el valor de la longitud de onda de emisión mostrado como por la longitud de onda de excitación utilizada. Teniendo en cuenta que el máximo de emisión para el triptófano libre en dicho medio se situó a 356 nm, y en función del desplazamiento del máximo de emisión obtenido para ambas enzimas, puede deducirse que los residuos de triptófano se encuentran parcialmente ocluidos en el interior de las proteínas en un microentorno hidrofóbico. La utilización de 295 nm como longitud de onda de excitación evita cualquier interferencia de los residuos de tirosina de la proteína (Eftink y Ghiron, 1976).

Cuando las muestras en NaCl 4M se excitaron a 275 nm para establecer la contribución de los residuos tirosilo al espectro de emisión de las proteínas, se observó que dicho espectro, para el caso de la NAD-GDH halofílica, no presentó

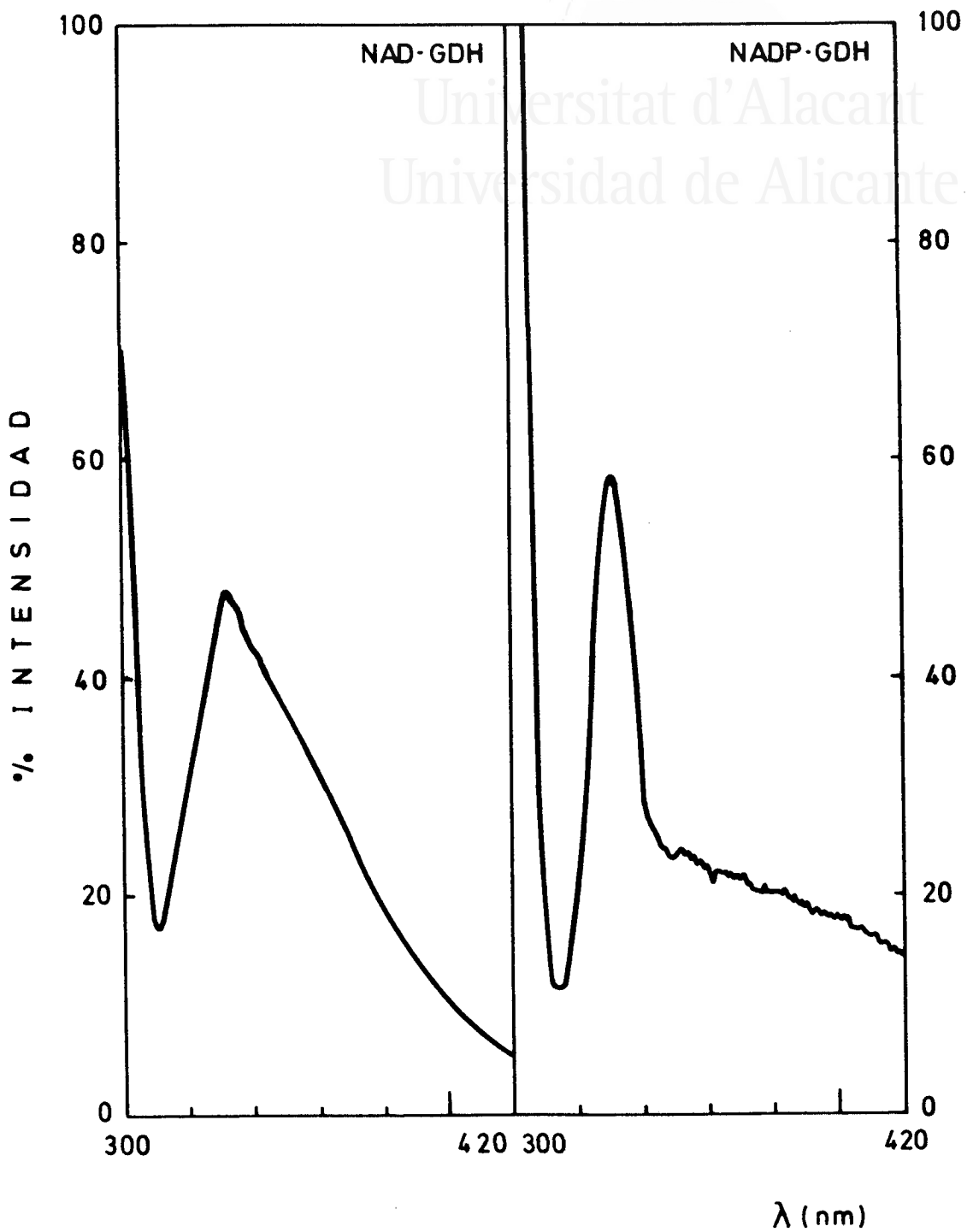


Figura 22 : Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de *H.halobium* en forma activa, con tampón fosfato sodico de 0.1M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Longitud de onda de excitación: 295 nm.

cambios significativos con respecto al mostrado a 295 nm; el máximo estuvo en 336 nm y se observó un pequeño hombro a 312nm (Fig. 23), lo que significa que la contribución de los residuos triptofanilo al espectro de emisión es casi total respecto a la de tirosilos. Sin embargo, para la NADP-GDH el espectro de emisión (Fig. 23) fue diferente del obtenido a 295 nm, mostrando un máximo de emisión a 307 nm y otro pico de menor intensidad a 340 nm, indicando que los residuos tirosilo contribuirían en mayor extensión que los triptofanilos a la fluorescencia de la enzima, lo que podría implicar una transferencia de energía de los residuos tirosilo (a 307 nm) a los triptofanilos (a 340 nm), y que estos residuos de triptófano están en un entorno hidrofílico más expuesto que los excitados a 295 nm (Lakowicz, 1983).

Forma inactiva.- Cuando se realizaron los espectros de emisión a la longitud de onda de excitación de 295 nm de las dos enzimas de *H.halobium* inactivadas mediante disminución de la concentración salina hasta 0.1M en NaCl por adición de tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.3 sin sales, se observó que la NAD-GDH (Fig. 24) presentaba una longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia a 332 nm, exactamente igual que para la enzima activa; esta longitud de onda indicaría que la contribución de los residuos de triptófano a la fluorescencia de la enzima era la misma en el estado activo que en el inactivo, ya que no se observó desplazamiento del máximo y la intensidad de fluorescencia fue similar. El hecho de que la longitud de onda de dicho máximo fuera de 332 nm indicó que la contribución de las energías a la fluorescencia se debió, casi exclusivamente, a residuos de triptófano que estaban en un medio hidrofóbico y parcialmente ocluidos. Cuando la excitación se realizó a 275nm (Fig. 25) se obtuvo un máximo de longitud de onda de emisión de fluorescencia a 340 nm, observándose un desplazamiento de 4 nm hacia longitudes de onda más largas respecto a la forma activa, lo que podría indicar una mayor exposición de los

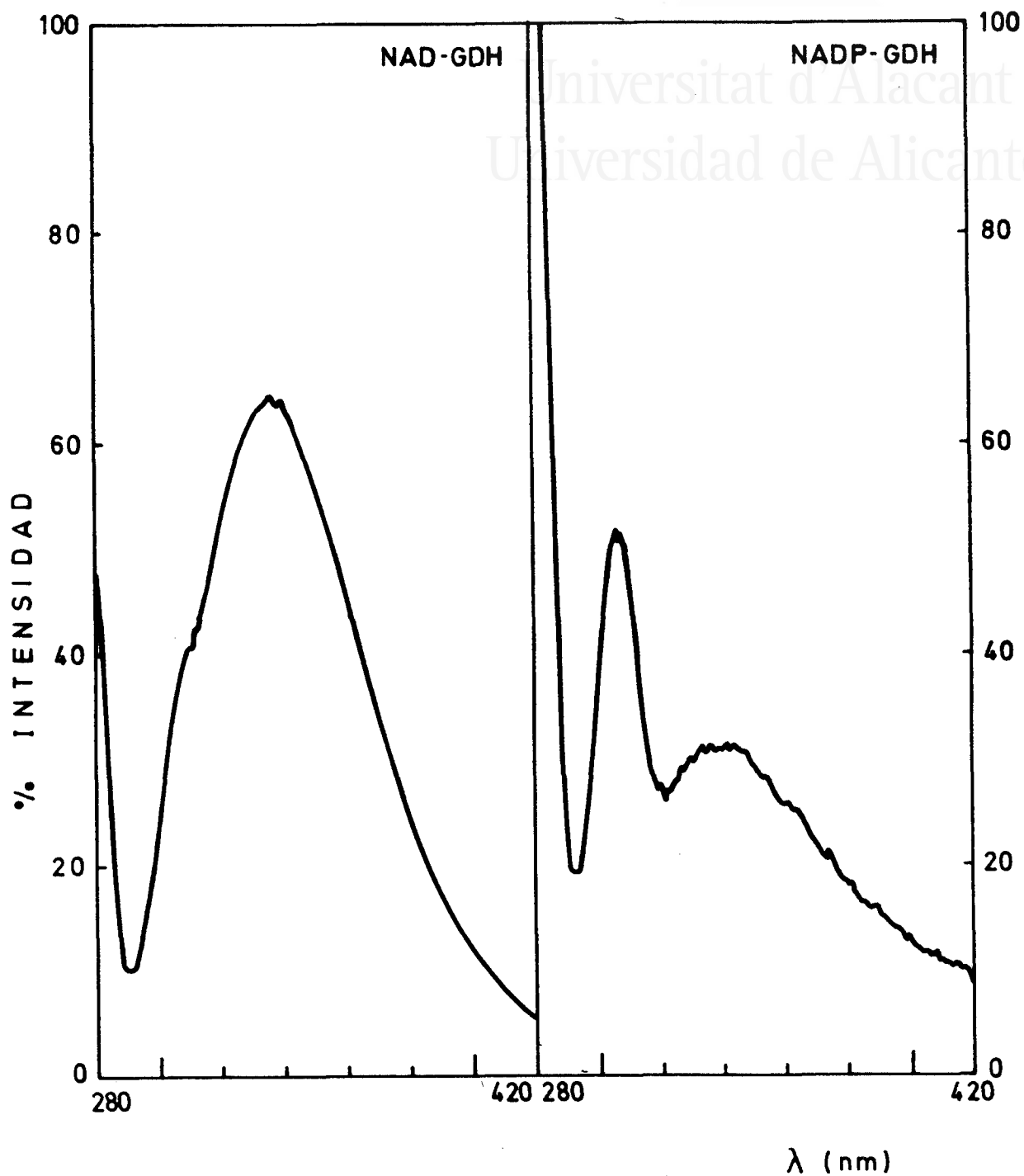


Figura 23 : Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de *H.halobium* en forma activa, con tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. Longitud de onda de excitación: 275 nm.

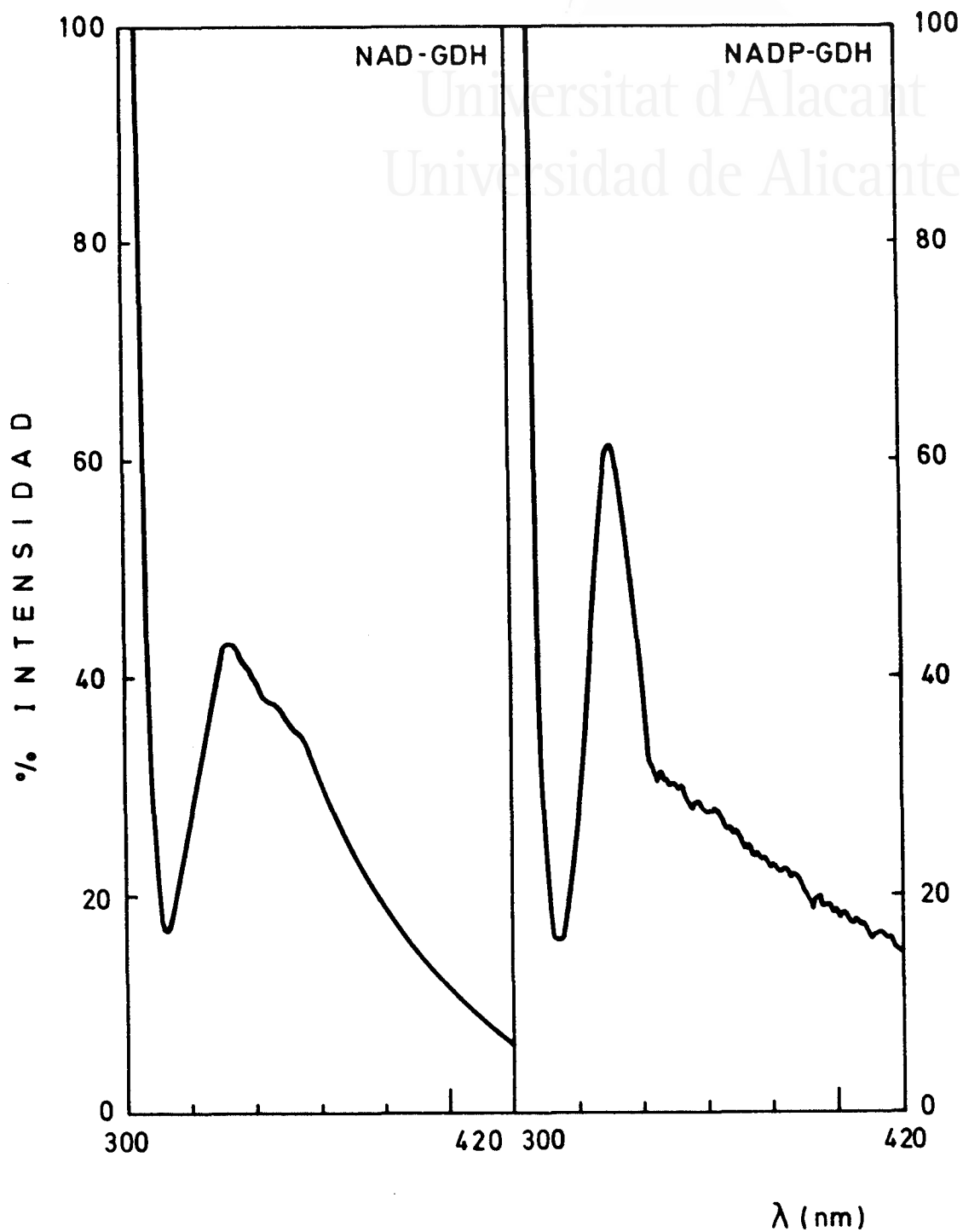


Figura 24 : Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de *H.halobium* en forma inactiva, con tampón fosfato sódico de 0.1M de pH 7.3 sin sal. Longitud de onda de excitación: 295 nm.

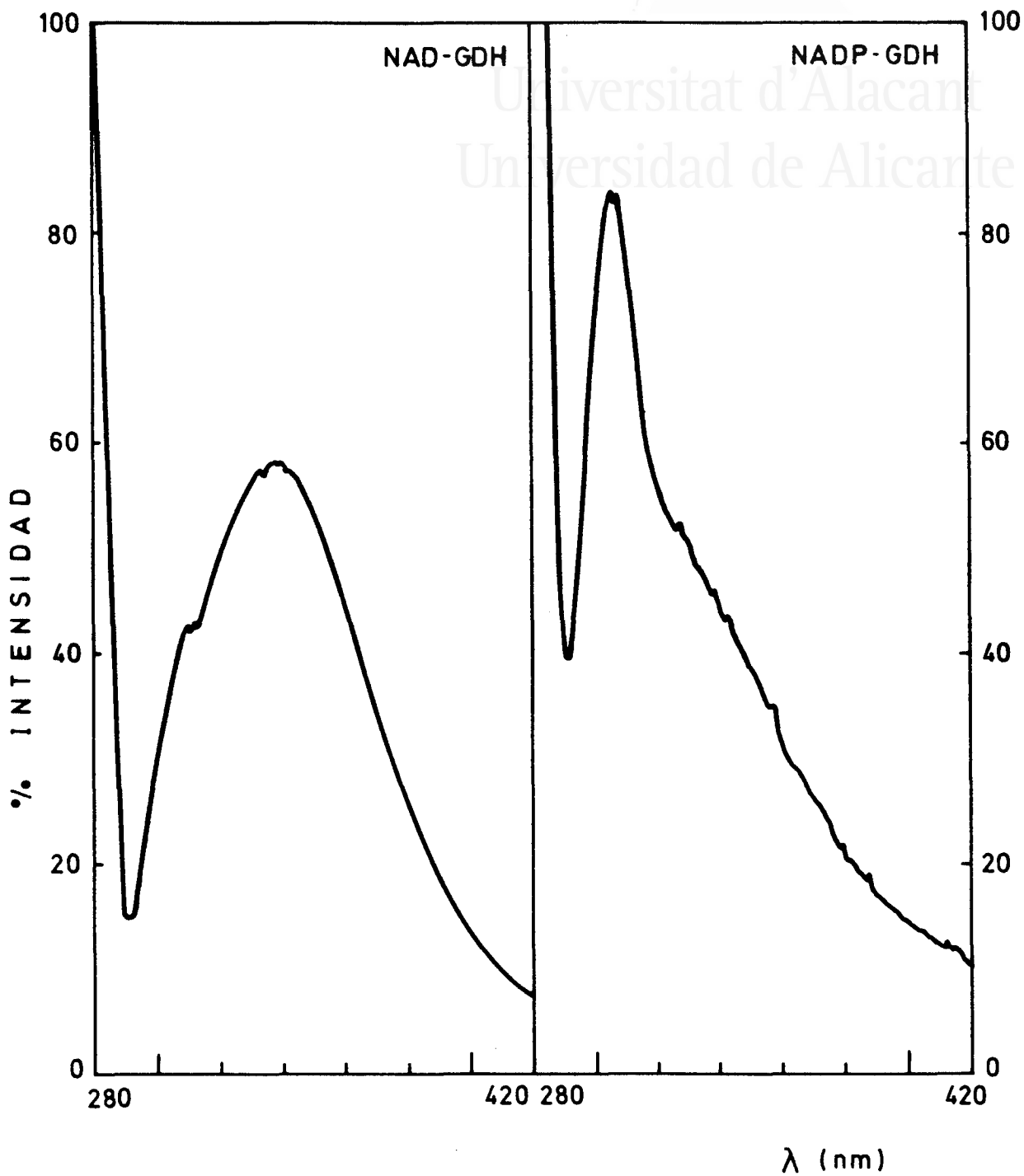


Figura 25 : Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de *H.halobium* en forma inactiva, con tampón fosfato sódico 0.1M de pH 7.3 sin sal. Longitud de onda de excitación: 275 nm.

triptofanilos al entorno acuoso, y que la proteína estuviera más desplegada que en la forma nativa (Eftink y Ghiron, 1976; Leicht y col., 1978).

Para la NADP-GDH ocurrió lo mismo cuando se excitó a 295 nm (Fig. 24), pero no así cuando la excitación se realizó a 275 nm (Fig. 25). En estas condiciones, para la enzima inactiva apareció un máximo a 306nm indicando que los residuos de tirosina contribuyeron casi totalmente a la fluorescencia de la enzima inactiva, y el pico a 340nm desapareció. Teniendo en cuenta el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia del triptófano, debe existir una mayor proporción de residuos expuestos de tirosina que de triptófano en el espectro de la enzima inactiva (Auer y Doty, 1966). Esto podría interpretarse también como una transferencia de energía entre residuos muy próximos en la forma activa, mientras que en la forma inactiva esta transferencia desaparece por alejamiento de los residuos triptofanilos y tirosilos (Freidelfer, 1979; Lakowicz, 1983).

La inactivación de malato y glutamato deshidrogenasas halofílicas (Eisenberg y col., 1977) a bajas concentraciones salinas está acompañada por cambios estructurales, como se refleja en la fluorescencia intrínseca y en los espectros de dicroísmo circular. A partir de la naturaleza de los cambios estructurales, la exposición de residuos triptofanilos a un entorno más polar y la pérdida de estructura α -hélice, se puede deducir que la conformación nativa es más compacta y más ordenada que la inactiva (Eisenberg y col., 1977).

En la Tabla 15 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de los espectros de emisión para NAD-GDH y NADP-GDH halofílicas en forma activa e inactiva.

Para NADP-GDH bovina (Frieden, 1963a) se observó un máximo de emisión a 350 nm cuando se excitó desde 280nm a 300nm, lo que indicó la total contribución de triptófanos a



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

TABLA 15

Efecto de la disminución de la concentración salina sobre la NAD- y NADP-glutamato deshidrogenasa de *H. halobium*. Valores de las longitudes de onda de emisión máximas e intensidades de fluorescencia correspondientes para ambas enzimas cuando se encuentran en estado activo e inactivo. **Activa:** En tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.3 conteniendo NaCl 4M. **Inactiva:** En tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.3 sin sales.

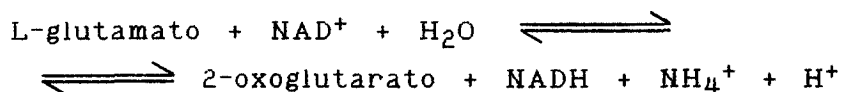
Enzima	L.onda ex.=295nm			L.onda ex.=275nm		
	L.onda emisión	I	Forma	L.onda emisión	I	Forma
NAD-GDH	332	48	Activa	336	64	Activa
	332	43	Inactiva	340	58	Inactiva
NADP-GDH	331	58	Activa	307/340	52/31	Activa
	331	62	Inactiva	306	84	Inactiva

la fluorescencia de la enzima. La enzima málica de hígado de paloma en estado nativo (Lee y col., 1988) produjo un máximo de emisión de fluorescencia a 328nm, con un hombro a 340nm; esto sugirió un entorno hidrofóbico para los residuos de triptófano, pero diferenciando dos grupos: los que aparecieron a 328nm, en un entorno hidrofóbico, y los de 340nm, en un entorno hidrofílico más expuesto. El desplegamiento de la enzima por adición de un agente desnaturizante (cloruro de guanidina) estuvo acompañado por un desplazamiento al rojo de la emisión de fluorescencia a 368 nm. Por otro lado, la malato deshidrogenasa de *Halobacterium* del Mar Muerto (Mevarech y col., 1977) también sufrió un cambio en su espectro de absorción cuando se inactivó por eliminación de sales. El máximo se desplazó desde 280nm en la enzima activa a 276nm en la inactiva, y la absorbancia específica disminuyó. El desplazamiento al azul del espectro y la disminución de la absorbancia se debieron, probablemente, a la exposición de los triptófanos desde un entorno hidrofóbico (tampón fosfato sódico 10mM pH 7.3 conteniendo NaCl 4.26M) al agua. Esta interpretación se basó en la observación de un cambio importante en el espectro de emisión de fluorescencia de la enzima a partir de la inactivación a 42.6mM de NaCl. La longitud de onda de excitación fue 280nm, y el máximo del espectro de emisión se desplazó desde 328nm en la enzima activa a 350nm en la forma inactiva, y la disminución de la fluorescencia debida al triptófano por causa de la inactivación estuvo acompañada por la aparición de un hombro en la banda de fluorescencia a una longitud de onda de 308nm, como consecuencia de la presencia de residuos de tirosina. Lo contrario le ocurrió a NADP-GDH de *H.halobium* cuando se inactivó; únicamente se observaron los residuos tirosilo al excitar a 275 nm y, en cambio, en forma activa se observaron éstos y un pequeño hombro debido, como ya se ha dicho, a la presencia de los residuos triptofanilos.

A la vista de los resultados se puede decir que tanto NAD-GDH como NADP-GDH de *H.halobium* poseen residuos de triptófano, tanto por el valor de la longitud de onda de emisión mostrado como por la longitud de onda de excitación empleada. Teniendo en cuenta que el máximo de emisión para el triptófano libre, en el mismo tampón que las enzimas, se cifra en 356nm, y en función del desplazamiento del máximo de emisión observado para ambas enzimas, puede deducirse que los residuos triptofanilo se encontrarían parcialmente ocluidos en el interior de las proteínas. Por otra parte, la intensidad del máximo de fluorescencia obtenido para la NADP-GDH fue mayor que el correspondiente para NAD-GDH, esto reflejaría un menor contenido de residuos en la NAD-GDH respecto a la NADP-GDH; esta diferencia de intensidad no puede atribuirse a diferentes grados de exposición en los residuos de las dos enzimas, pues la longitud de onda máxima de emisión es similar en ambos casos. Cuando la excitación se realizó a 275nm para establecer la contribución de los residuos de tirosilo al espectro de emisión de la proteína, en NAD-GDH no se produjo cambio en el espectro obtenido, por lo que dichos residuos no contribuyen al espectro de fluorescencia de la enzima, en cambio en NADP-GDH sí se produjo un cambio en el espectro, y con valores de intensidad elevados, con lo cual se podría decir que esta enzima posee residuos tirosilo que contribuyen al espectro.

4.3. ESTUDIO DEL MECANISMO CINÉTICO.

La reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa (EC. 1.4.1.3) implica, además de agua y un protón, dos sustratos en la dirección de desaminación oxidativa y tres en la de aminación reductiva:



La enzima NAD-glutamato deshidrogenasa desempeña un papel importante en el catabolismo de glutamato (Smith y col., 1975); sin embargo, se ha prestado poca atención al mecanismo cinético de esta enzima halofílica y no hay datos que hagan referencia a él.

Para realizar estudios de este tipo se emplean varios métodos, entre ellos: velocidades iniciales, inhibición por productos e inhibición por análogos de sustratos, que son los que se han utilizado para NAD-GDH de *H.halobium*, como se verá a continuación.

4.3.1. Estudio de velocidades iniciales.

En la Fig.26 se muestran los resultados obtenidos por el método de velocidades iniciales para la reacción de desaminación oxidativa catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium*; como se puede observar, se obtuvieron rectas intersectantes cuando se varió el sustrato NAD^+ y se mantuvo el glutamato a varias concentraciones fijas. Al representar glutamato como sustrato variable, con diferentes concentraciones de NAD^+ como sustrato fijo, de nuevo se obtuvieron rectas intersectantes como se muestra en la Fig.27. Aunque estos resultados no revelaron nada sobre el orden de



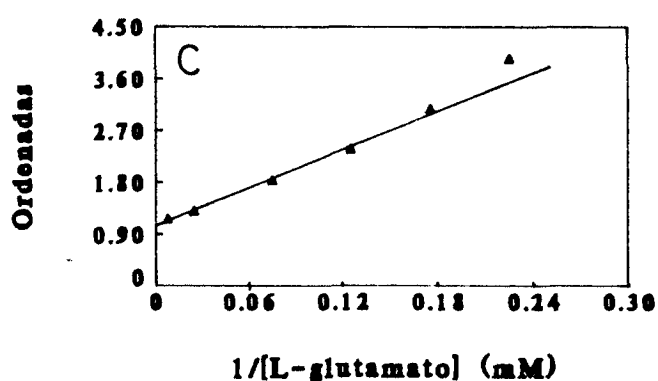
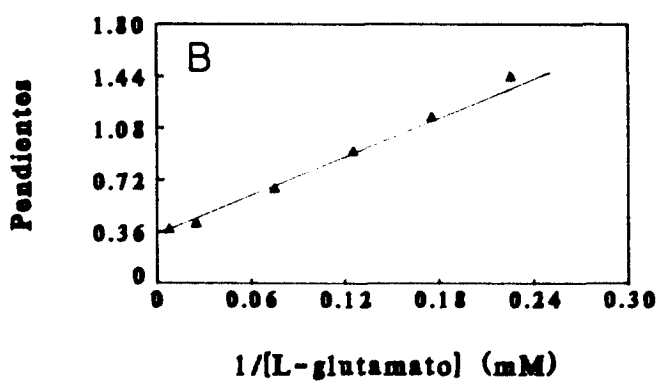
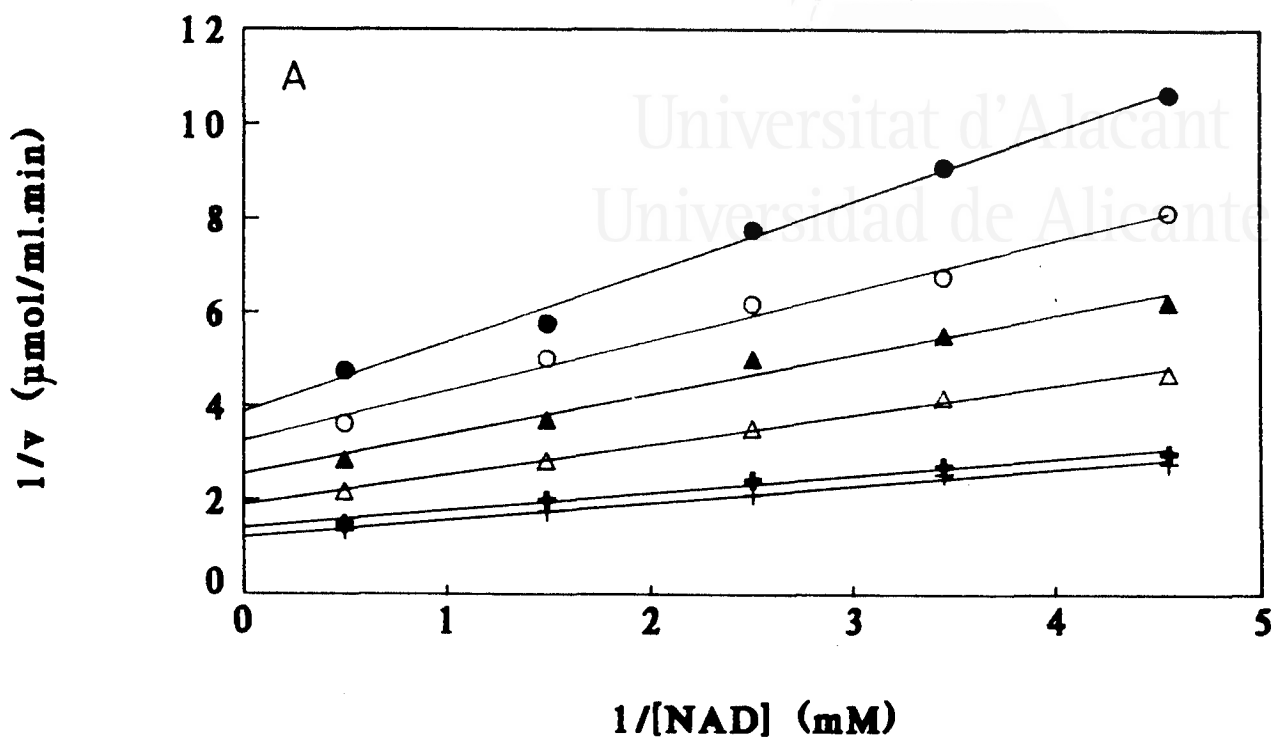


Figura 26 : Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de NAD⁺, a varias concentraciones fijas de L-glutamato: (●) 4.44mM, (○) 5.71mM, (▲) 8.0mM, (△) 13.33mM, (⊕) 40mM y (+) 120mM. B: Representación de las pendientes frente al inverso de la concentración de glutamato. C: Representación de las ordenadas frente al inverso del mismo sustrato.

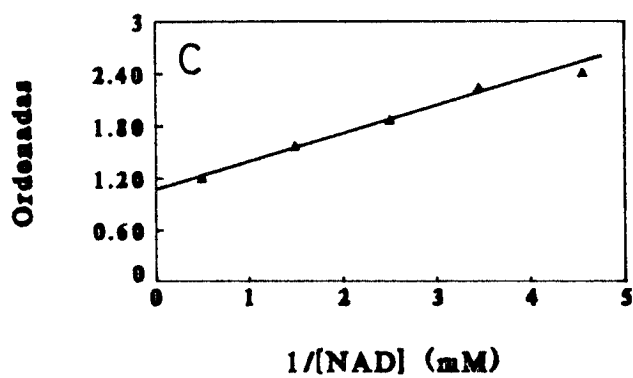
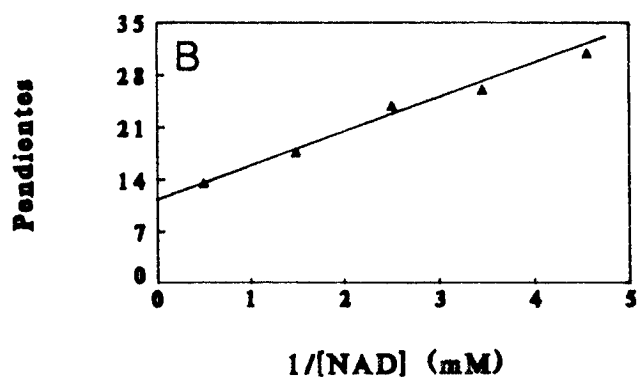
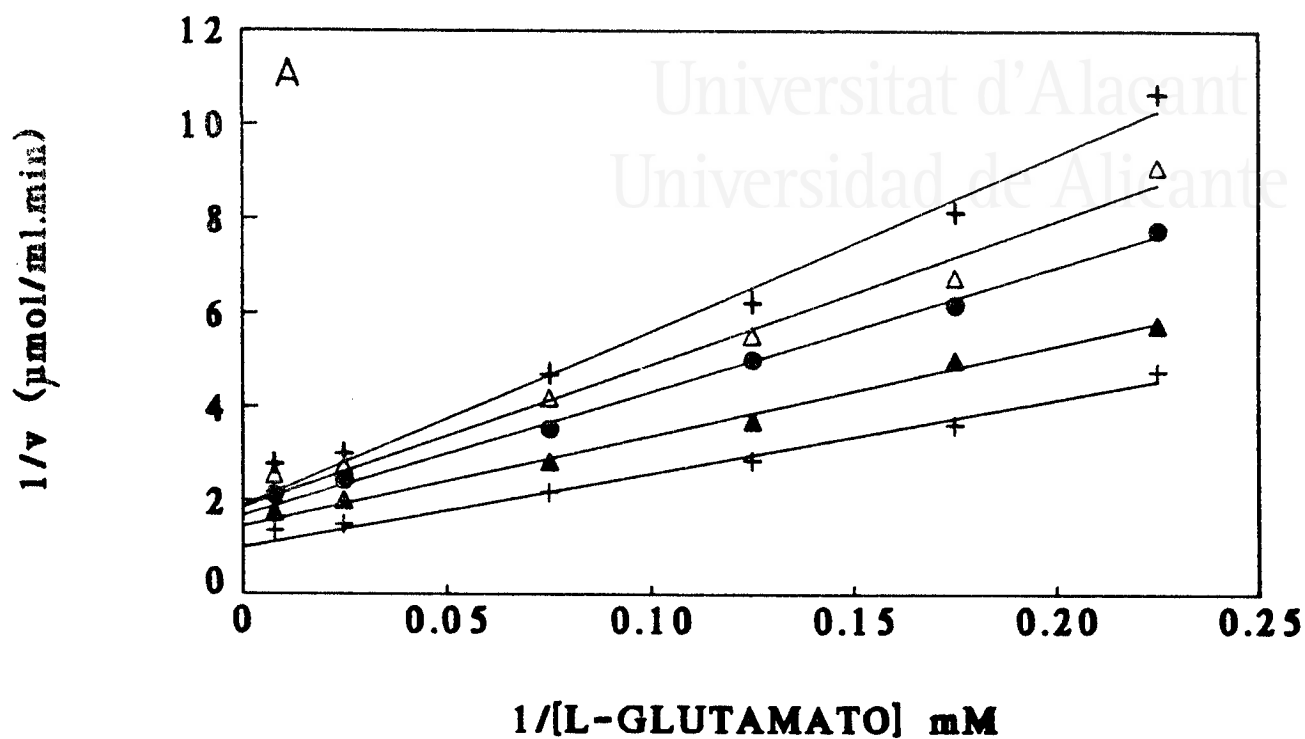


Figura 27 : A: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de L-glutamato, a varias concentraciones de NAD^+ : (+) 0.22mM, (Δ) 0.29mM, (\bullet) 0.4mM, (\blacktriangle) 0.67mM y (+) 2.0mM. B: Representación de las pendientes frente al inverso de la concentración de NAD^+ . C: Representación de las ordenadas frente al inverso del mismo sustrato.

adición de los sustratos, si permitieron excluir un mecanismo ping-pong, al menos como el camino principal, ya que ninguna de las representaciones presentó un patrón paralelo, y demostraron que antes de que se libere cualquiera de los productos de la reacción se forma un complejo ternario entre la enzima, glutamato y NAD^+ , característico de un mecanismo secuencial respecto a la adición de sustratos. Los datos obtenidos del estudio de velocidades iniciales se ajustaron a las ecuaciones 1 y 2, correspondientes a un mecanismo ordenado en estado estacionario o a un mecanismo ordenado en equilibrio, respectivamente:

$$v = VAB / (K_aB + K_bA + AB + K_{ia}K_b) \quad (1)$$

$$v = VAB / (K_bA + AB + K_{ia}K_b) \quad (2)$$

El ajuste con el valor de "sigma" más bajo correspondió a la ecuación 1. Cuando los datos se ajustaron a dicha ecuación, las constantes de Michaelis para NAD^+ (K_a) y glutamato (K_b) fueron $0.32 \pm 0.02\text{mM}$ y $10.8 \pm 0.9\text{mM}$ respectivamente. La constante de disociación para NAD^+ (K_{ia}) fue $0.40 \pm 0.06\text{mM}$. El valor de K_{ia}/K_a es 1.26 indicando que, para ambos patrones de velocidad inicial, los puntos de intersección deben estar por encima del eje horizontal, por lo que la unión del sustrato constante disminuye la K_m aparente del sustrato variable (Cleland, 1970). Como se puede observar en ambas Figuras, las representaciones secundarias de pendientes y ordenadas, frente al inverso de la concentración del sustrato que se mantuvo fijo en cada caso, fueron lineales, indicando que los sustratos se unen a una sola forma de la enzima (Cleland, 1963c).

4.3.2. Estudios de inhibición por producto.

Lo que se entiende por "inhibición por producto" es el resultado de la formación de los mismos complejos que aparecen cuando este producto es el sustrato de la reacción inversa (Cleland, 1970), dando información adicional que no es posible obtener con los patrones de velocidad inicial (Cleland, 1977). Los estudios de inhibición por producto se realizaron para poder interpretar el orden de adición de los sustratos y de liberación de los productos de la enzima. Del mismo modo que en los patrones de velocidad inicial, los de inhibición se completan representando las pendientes y/u ordenadas frente a la concentración de inhibidor. La constante de inhibición para las pendientes (K_{is}) o para las ordenadas (K_{ii}) son las intersecciones de tales representaciones secundarias con el eje de abscisas (Cleland, 1970).

Desaminación oxidativa.- Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 16, donde también se incluyen las referencias de las Figuras correspondientes a cada caso.

Con 2-oxoglutarato como inhibidor y NAD^+ o glutamato como sustratos variables se obtuvieron comportamientos no competitivos (Fig. 28A y 28B, respectivamente). El sustrato fijo correspondiente se mantuvo a una concentración insaturante. Según indica esta Tabla, estas dos representaciones no siguieron el modelo esperado, puesto que tenían que haber dado acompetitivas. Cuando el amonio fue el inhibidor y glutamato o NAD^+ los sustratos variables, se obtuvieron inhibiciones no competitivas (Fig.29A y 29B, respectivamente). La inhibición por el producto NADH fue no competitiva con glutamato (Fig.29C) y competitiva con respecto a NAD^+ (Fig. 30). La inhibición competitiva indica una unión

TABLA 16

Constantes cinéticas y de inhibición aparentes para NAD-GDH de *Halobacterium halobium*, determinadas partir de los datos de inhibición por producto. Patrones observados y predichos de las inhibiciones por producto para un mecanismo BI-TER estrictamente ordenado, suponiendo que no se forman complejos dead-end y que no hay etapas de equilibrio rápido (Segel, 1975). Todos los datos se obtuvieron a pH 9.0 en tampón Tris-HCl 0.1M conteniendo NaCl 3M, a 40°C. Los sustratos fijos se mantuvieron insaturados. **Reacción de desaminación.**

Sustrato variable	$K_m \pm S.E.$ (mM)	Producto inhibidor (No fig.)	$K_{ii} \pm S.E.$ (mM)	$K_{is} \pm S.E.$ (mM)	Patrón	Sustratos fijos
L-glutamato	11.91 \pm 0.92	NADH (29C)	0.020 \pm 0.002	0.011 \pm 0.002	Nca/Ncb	
	12.11 \pm 0.71	2-KG (28B)	18.4 \pm 1.3	13.6 \pm 1.8	Nca/UCC	NAD ⁺
	16.47 \pm 1.04	Amonio (29A)	204 \pm 43	81 \pm 10	Nca/Ncb	0.25 mM
NAD ⁺	0.34 \pm 0.01	NADH (30)		0.0073 \pm 0.0002	Ca/Cb	
	0.36 \pm 0.05	2-KG (28A)	22 \pm 3	32 \pm 10	Nca/UCC	Glu
	0.38 \pm 0.05	Amonio (29B)	96 \pm 17	105 \pm 40	Nca/Ncb	12 mM

a Patrones de inhibición observados. **b** Patrones de inhibición predichos. **c** Patrones de inhibición predichos si el 2-oxoglutarato fuera el segundo producto.

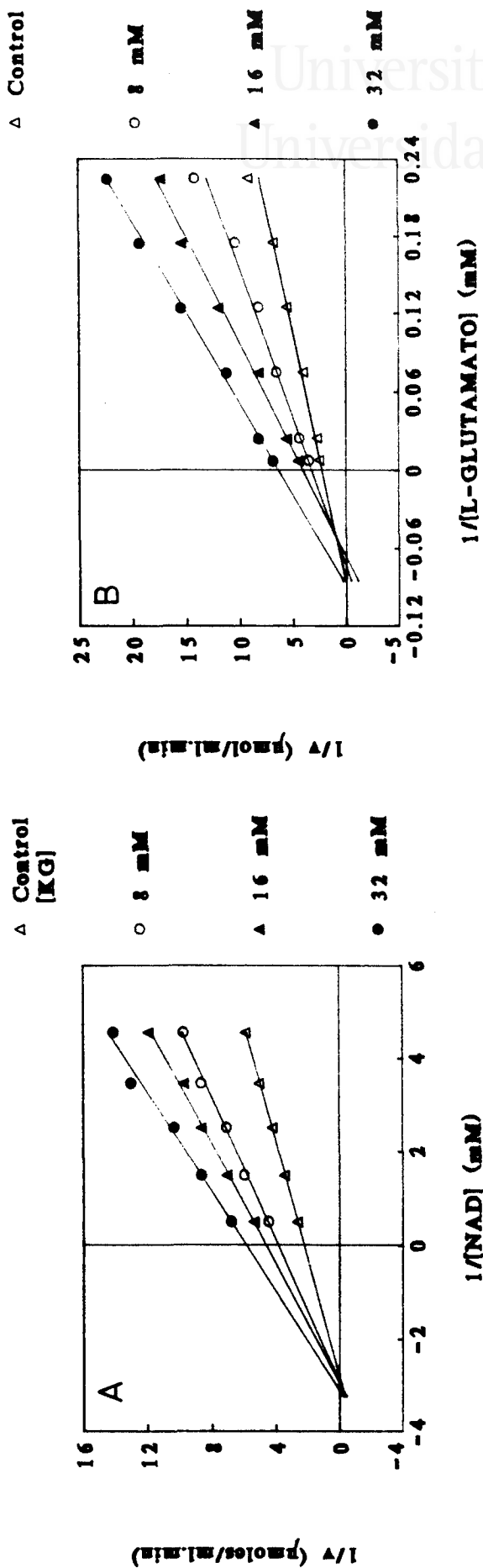


Figura 28 : Inhibición por 2-oxoglutarato en la reacción de desaminación oxidativa frente a NAD^+ (A) manteniendo glutamato a 12mM, y (B) frente a glutamato manteniendo NAD^+ a 0.25mM. Se utilizó tampón glicina-NaOH 0.1M de pH 9.0 con NaCl 3M.

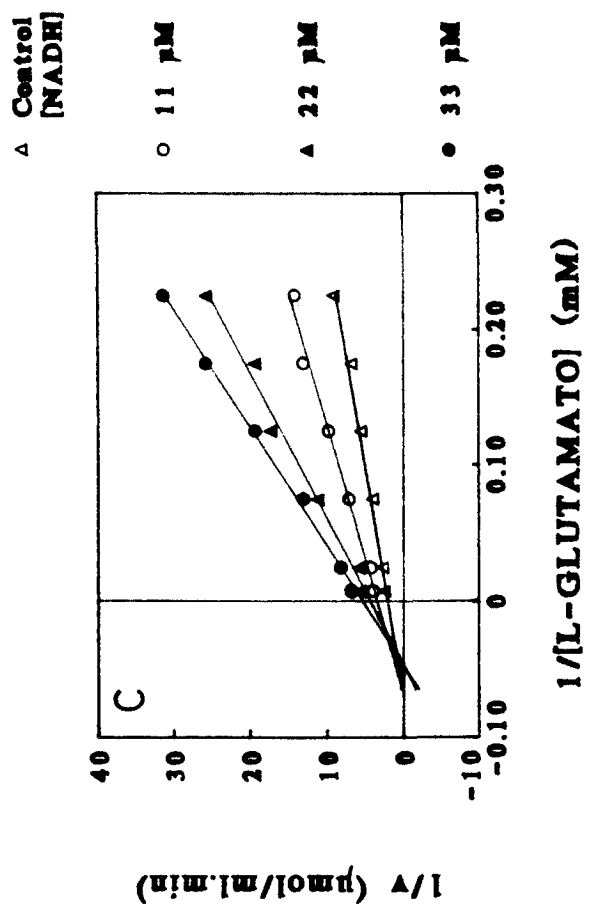
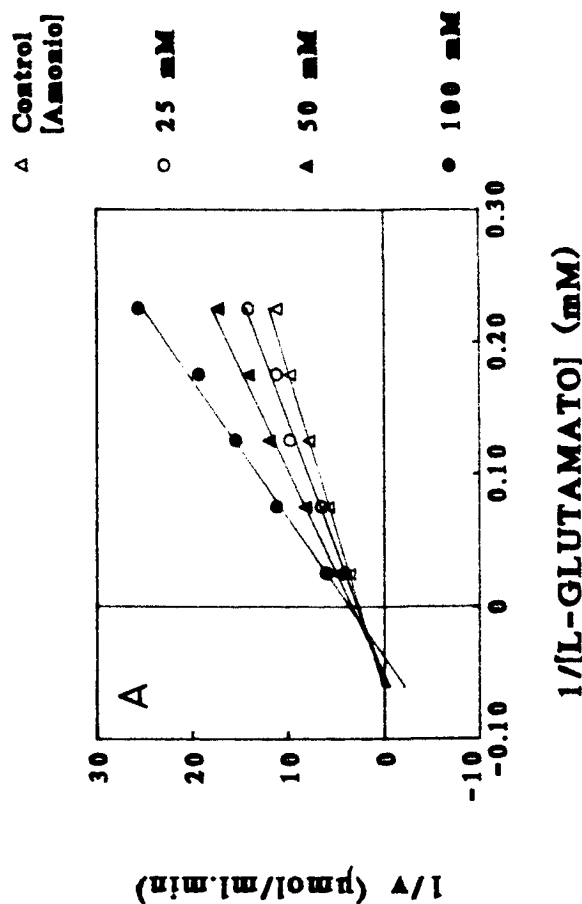
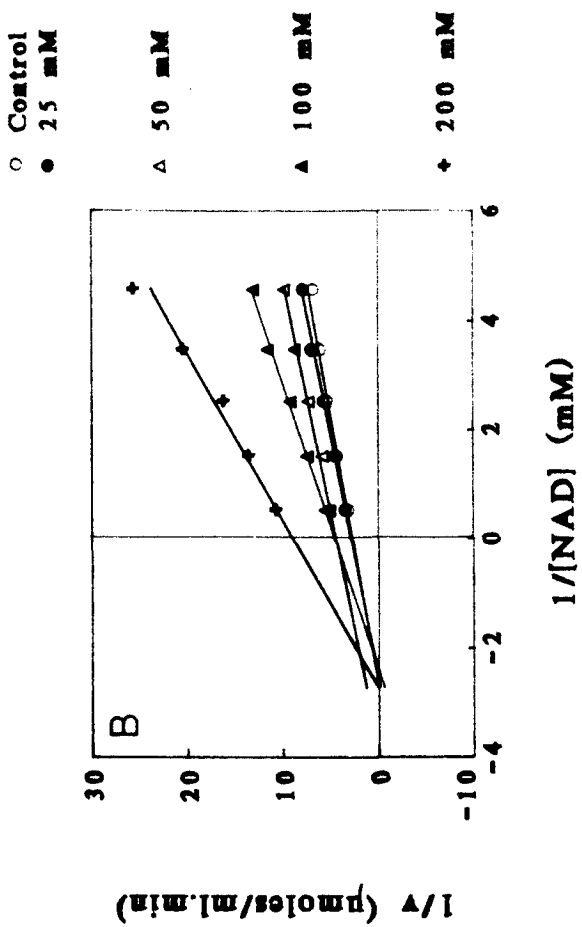


Figura 29 : Inhibición por amonio (A) frente a glutamato, y (B) frente a NAD⁺, manteniendo el sustrato fijo correspondiente a una concentración insaturante. C: Inhibición por NADH frente a glutamato para NAD⁺ insaturante (0.25mM).

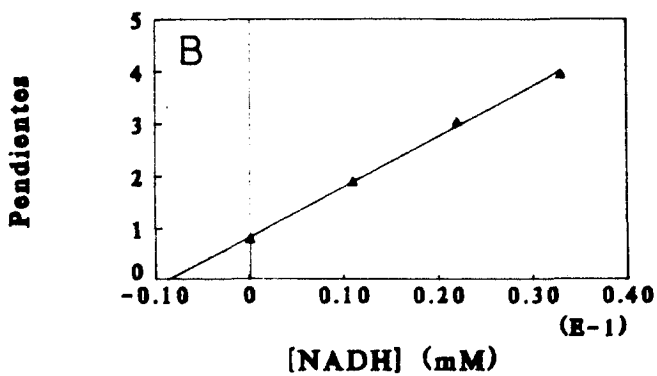
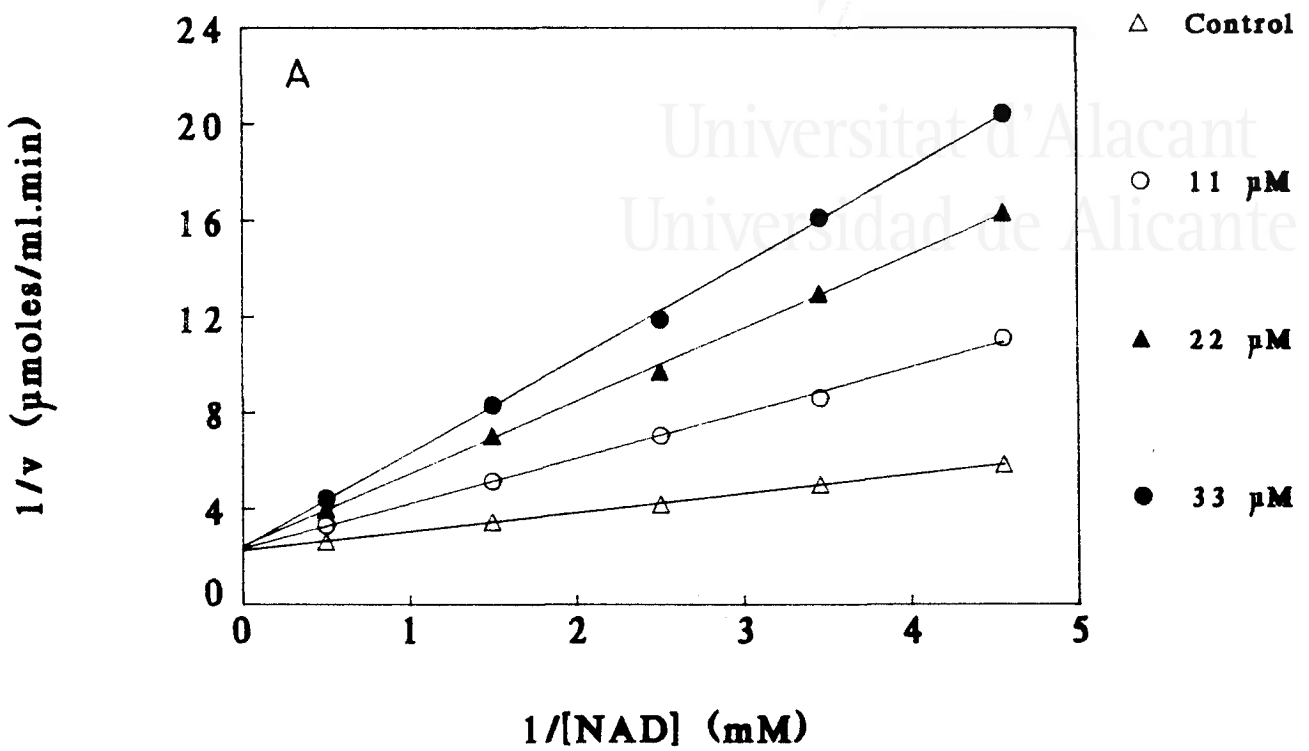


Figura 30 :

A: Inhibición por NADH en la desaminación oxidativa frente a NAD^+ manteniendo L-glutamato a 12mM. B: Representación secundaria de las pendientes de (A) frente a la concentración de inhibidor.

mutuamente excluyente del inhibidor (NADH) y sustrato (NAD⁺) y sugiere que se unen a la misma forma de la enzima (enzima libre). Por lo tanto, el NAD⁺ puede ser el primer sustrato que se une y NADH el último producto que se libera en la reacción de desaminación (oxidación de glutamato). Esto está de acuerdo con los resultados de Frieden (1959) para glutamato deshidrogenasa de hígado bovino con NADP⁺ y NADPH; o para ambas GDHs de *T.novellus* (LéJohn y col., 1968); para NADP-GDH de *B.flavum* (Shiio y Ozaki, 1970), o para NADP-GDH de *S.typhimurium* (Coulton y Kapoor, 1973b); y para otras deshidrogenasas (Hsu y col., 1967; Orsi y Cleland, 1972; Buzdygon y col., 1973; Schimerlik y Cleland, 1977; Grimshaw y Cleland, 1981; Schrimsher y Taylor, 1984; Nimmo, 1986; Carvajal y Kessi, 1988).

Aminación reductiva.- Los resultados obtenidos del estudio de las inhibiciones por producto para esta dirección de la reacción se resumen en la Tabla 17, incluyendo las referencias de las Figuras correspondientes.

La indicación de que NADH y NAD⁺ se unen a la enzima libre se confirma también con los patrones de inhibición por el producto NAD⁺ frente a NADH variable (Fig.31A), manteniendo fijos a bajas concentraciones los sustratos 2-oxoglutarato y amonio. La inhibición no competitiva por glutamato con respecto a NADH (Fig.31B), amonio (Fig.32B) y 2-oxoglutarato (Fig. 33B) concuerda con el hecho de que el primer producto que se libera en la reacción de aminación (síntesis de glutamato) sea el glutamato. Así, los sustratos variables no pueden impedir la combinación del inhibidor, y los puntos de combinación de glutamato y por lo tanto sustratos están conectados mediante una secuencia reversible (Segel, 1975). Del mismo modo, el NAD⁺ presentó inhibición no competitiva con respecto al amonio (Fig.32A) y a 2-oxoglutarato (Fig.33A), en el sentido definido por Cleland (1963b), que requiere una alteración de las pendientes y ordenadas de las representaciones de Lineweaver-Burk. Los patrones obtenidos son los correspondientes a un mecanismo ordenado.

TABLA 17

Constantes cinéticas y de inhibición aparentes para NAD-GDH de *Halobacterium halobium*, determinadas a partir de los datos de inhibición por producto. Patrones observados y predichos de las inhibiciones por producto para un mecanismo BI-TER estrictamente ordenado, suponiendo que no se forman complejos dead-end y que no hay etapas de equilibrio rápido (Segel, 1975). Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Tabla 16. **Reacción de aminación.**

Sustrato variable	$K_m \pm S.E.$ (mM)	Producto inhibidor	$K_{ij} \pm S.E.$ (mM)	$K_{is} \pm S.E.$ (mM)	Patrón	Sustratos fijos
NADH	0.026 ± 0.001	NAD ⁺ (31A)		0.54 ± 0.03	Ca/Cb	KG = 7.5 mM NH ₄ ⁺ = 0.115 M
NADH	0.019 ± 0.001	L-glutamato (31B)	179 ± 18	830 ± 515	NCa/NCb	KG = 7.5 mM NH ₄ ⁺ = 0.115 M
Amonio	109 ± 17	NAD ⁺ (32A)	0.63 ± 0.14	2.1 ± 1.3	NCa/NCb	KG = 15 mM NADH = 23 μM
Amonio	110 ± 18	L-glutamato (32B)	331 ± 120	250 ± 78	NCa/NCb	KG = 15 mM NADH = 23 μM
2-KG	2.71 ± 0.19	NAD ⁺ (33A)	0.80 ± 0.05	2.5 ± 1.2	NCa/NCb	NADH = 23 μM NH ₄ ⁺ = 0.23 M
2-KG	2.6 ± 0.4	L-glutamato (33B)	612 ± 163	82.46 ± 16.93	NCa/NCb	NADH = 23 μM NH ₄ ⁺ = 0.23 M

Patrones de inhibición por producto ^aobservados y ^bpredichos.

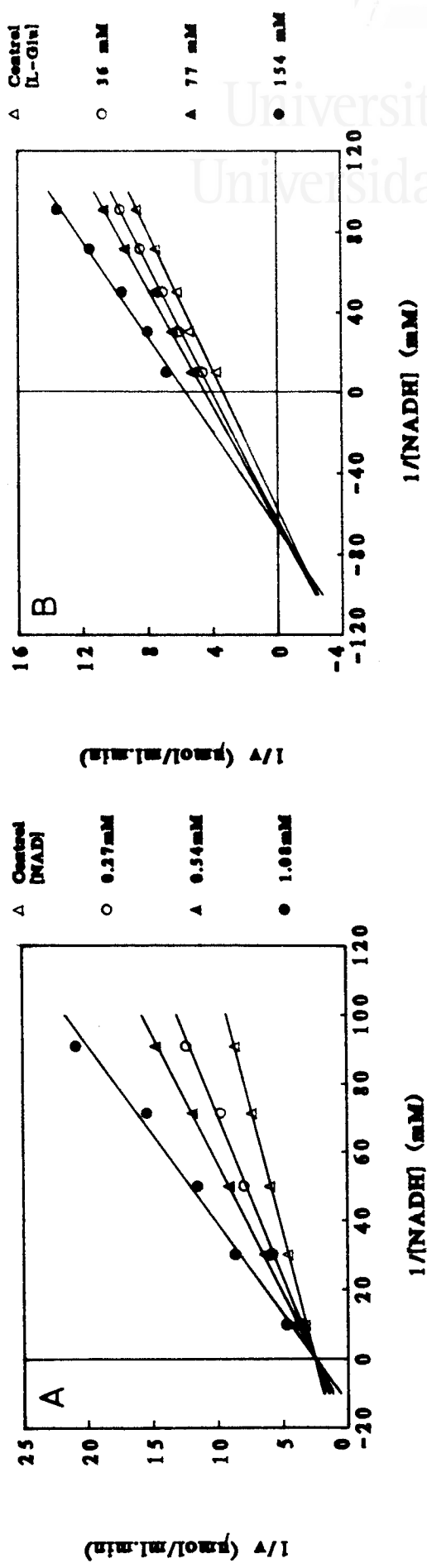


Figura 31 : Inhibición por NAD⁺ (A) y por L-glutamato (B) en la aminación reductiva frente al sustrato NADH. Las concentraciones de los otros sustratos fijos fueron 2-oxoglutarato 7.5mM y amonio 115mM.

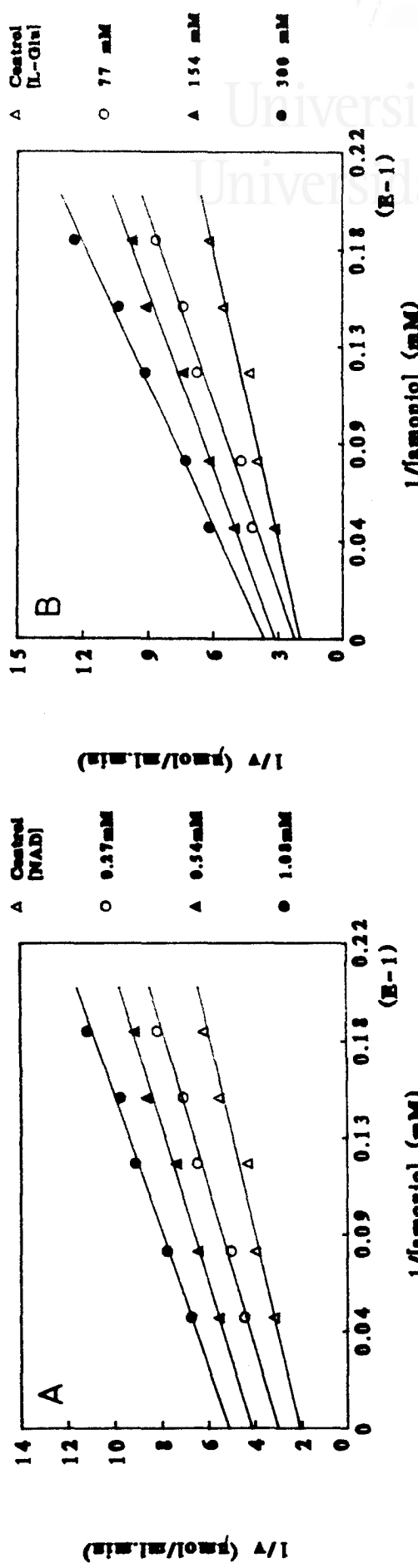


Figura 32 : Inhibición por NAD⁺ (A) y por L-glutamato (B) en la aminación reductiva frente al sustrato amonio. Las concentraciones de los otros sustratos fijos fueron 2-oxoglutarato 15mM y NADH 0.023mM.

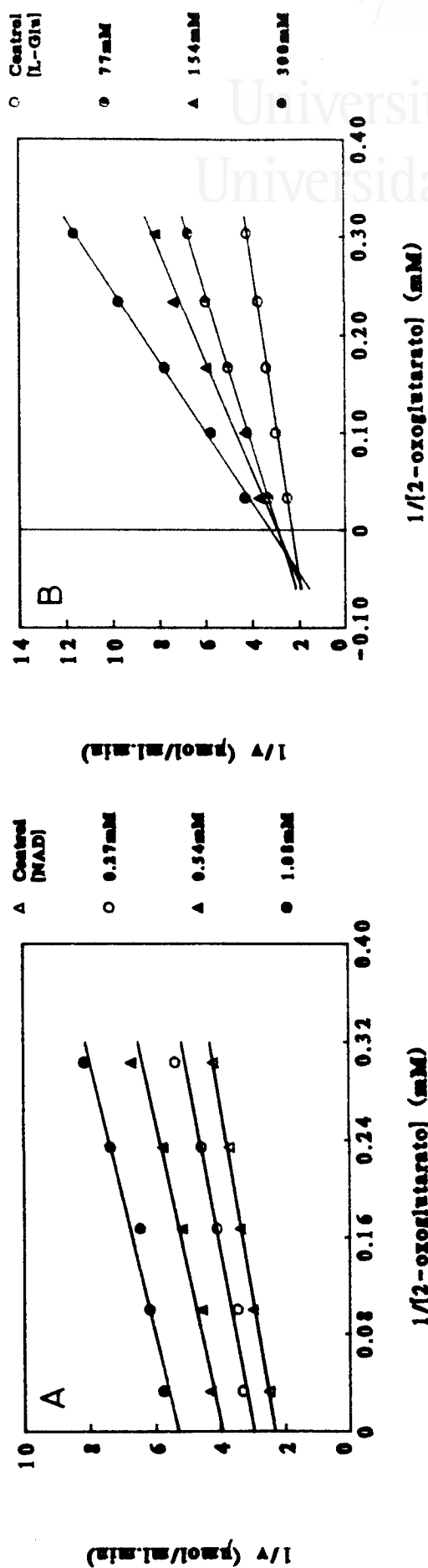


Figura 33 : Inhibición por NAD^+ (A) y por L-glutamato (B) en la aminación reductiva frente al sustrato 2-oxoglutarato. Las concentraciones de los otros sustratos fijos fueron amonio 230mM y NADH 0.023mM.

4.3.3. Estudios de inhibición por análogos de sustratos.

Rudolph y Fromm (1969) demostraron la utilidad de estudiar el mecanismo cinético de sistemas de enzimas con tres sustratos utilizando inhibidores competitivos de sustratos junto con productos inhibidores. La ventaja de utilizar compuestos que compiten con los sustratos por el mismo centro enzimático, en sistemas ordenados y a partir de una dirección única, permite determinar la secuencia de adición de los mismos y dan información definitiva de la naturaleza de las interacciones entre la enzima y los sustratos (Fromm, 1967).

Se realizaron estudios utilizando glutarato e hidroxilamina como inhibidores competitivos de 2-oxoglutarato y amonio, respectivamente, para NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* en la reacción de aminación. Los tipos de inhibición obtenidos con la realización de estos experimentos se muestran en la Tabla 18. Bell y col. (1985) mostraron que el glutarato (análogo de glutamato) era un inhibidor competitivo con respecto a 2-oxoglutarato en la reacción de aminación reductiva para glutamato deshidrogenasa de hígado bovino. Para NAD-GDH halofílica, el glutarato es competitivo frente a 2-oxoglutarato (Fig.34A), no competitivo frente a amonio (Fig.34B) y incompetitivo frente a NADH (Fig.34C). La hidroxilamina es competitiva frente a amonio (Fig.35A) y incompetitiva frente a NADH (Fig.35B) y 2-oxoglutarato (Fig.35C). Estos resultados también están de acuerdo con que el NADH sea el primer sustrato de la reacción de aminación, ya que para ambos inhibidores presenta un patrón incompetitivo (Fromm, 1975a); resultados similares se obtienen con octopina deshidrogenasa de *C.concholepas* (Carvajal y Kessi, 1988) y sus inhibidores correspondientes. La inhibición incompetitiva por glutarato e hidroxilamina con respecto a NADH indica que el punto de combinación del

TABLA 10

Constantes de inhibición para la reacción de aminación reductiva catalizada por glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente de *Halobacterium halobium* con glutarato e hidroxilamina como inhibidores. Las condiciones experimentales son las mismas que las dadas en la Tabla 16.

Sustrato variable	$K_m \pm S.E.$ (mM)	Inhibidor (No fig.)	$K_{i1} \pm S.E.$ (mM)	$K_{i2} \pm S.E.$ (mM)	Patrón	Sustratos fijos
Amonio	234 ± 20	Glutarato (34B)	60 ± 8	169 ± 27	NC	KG = 15mM NADH = 23µM
2-oxoglutarato	4.7 ± 0.3	Glutarato (34A)		25.6 ± 3.3	C	NADH = 23µM NH_4^+ = 134mM
NADH	0.022 ± 0.001	Glutarato (34C)	97 ± 5		UC	KG = 15 mM NH_4^+ = 134mM
Amonio	69 ± 7	Hidroxilamina (35A)		4.0 ± 0.2	C	KG = 15 mM NADH = 23µM
NADH	0.019 ± 0.001	Hidroxilamina (35B)	27 ± 2		UC	KG = 15 mM NH_4^+ = 134mM
2-oxoglutarato	8.5 ± 1.7	Hidroxilamina (35C)	3.3 ± 0.6		UC	NADH = 23µM NH_4^+ = 134mM

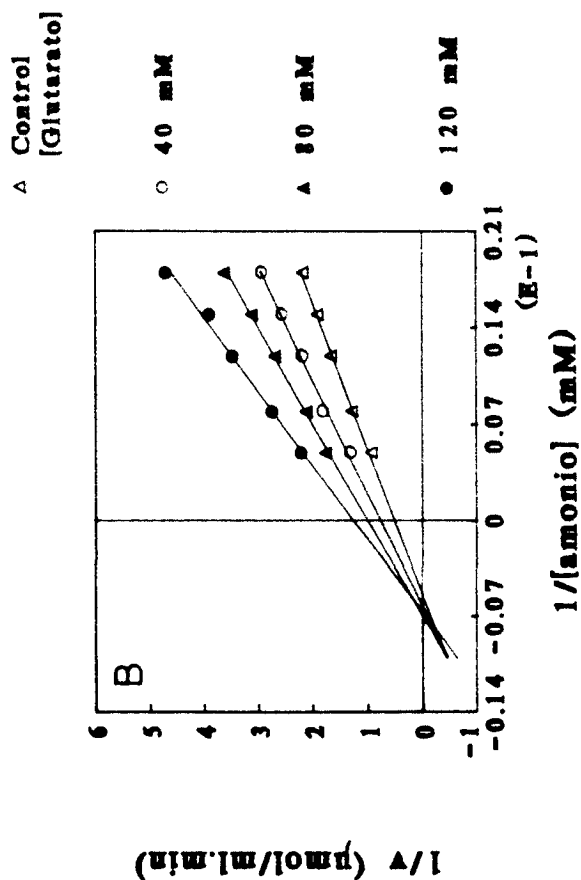
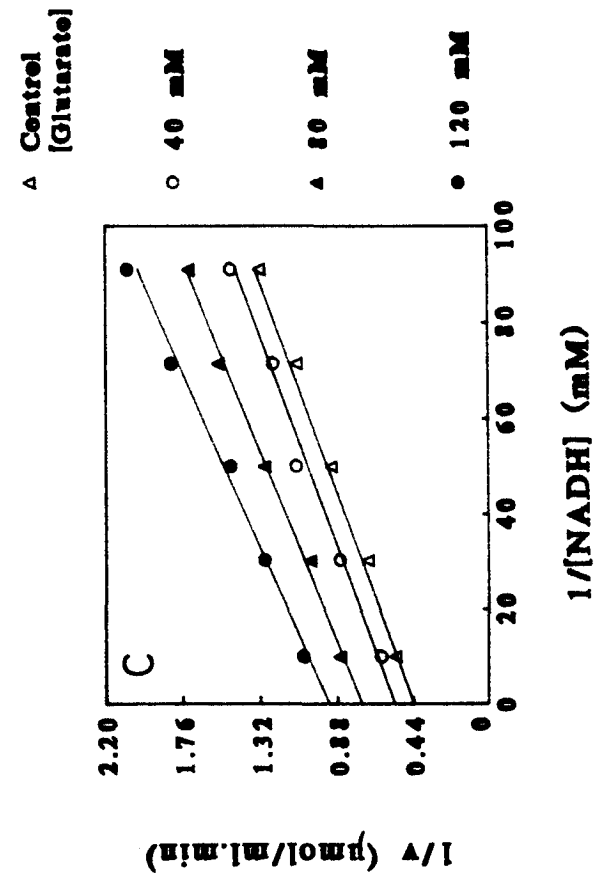
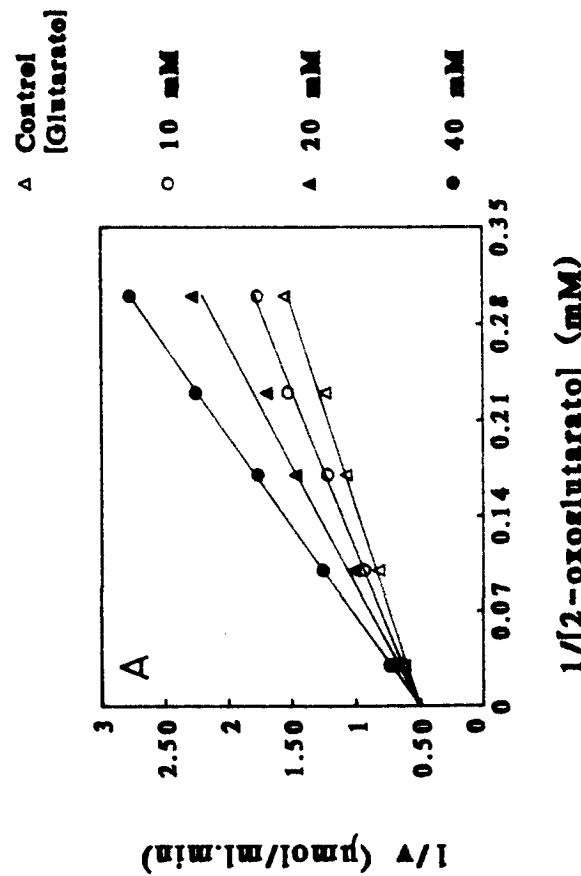


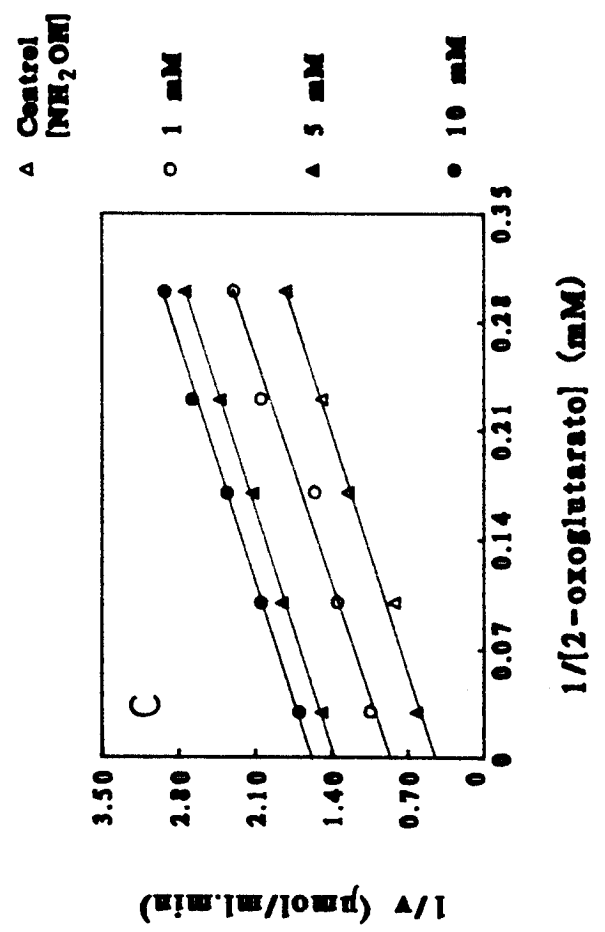
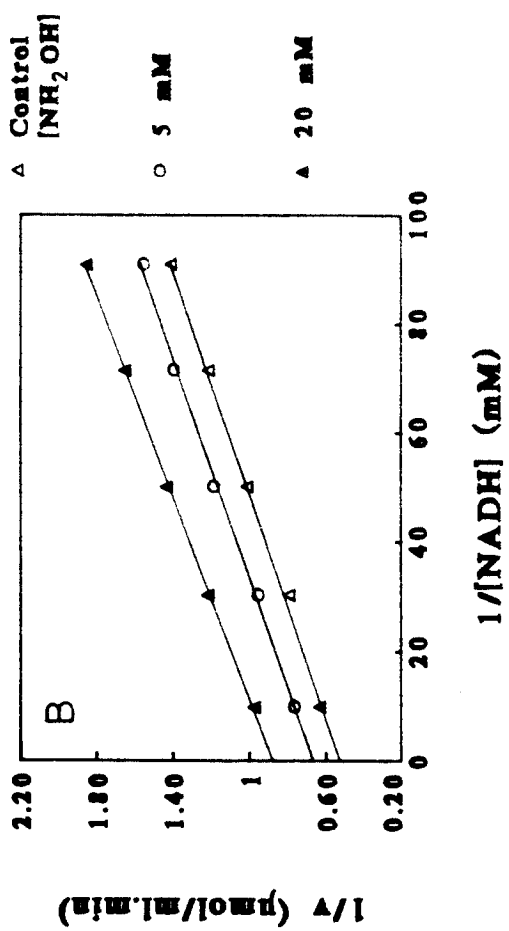
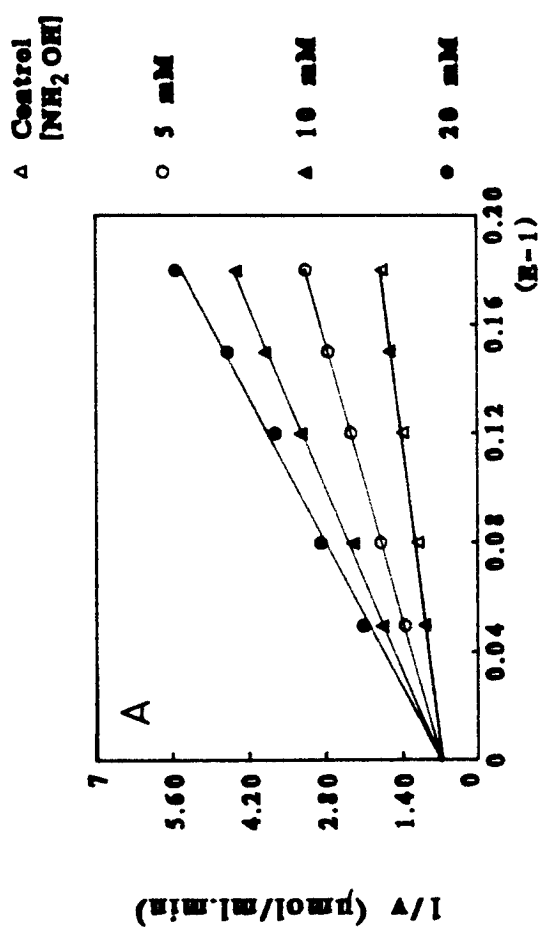
Figura 34 : Inhibición por glutarato en la aminación reductiva frente a (A) 2-oxoglutarato, (B) amonio y (C) NADH. Las concentraciones de los sustratos que se mantuvieron fijos en cada caso fueron 2-oxoglutarato 15mM, NADH 0.023mM y amonio 134mM.





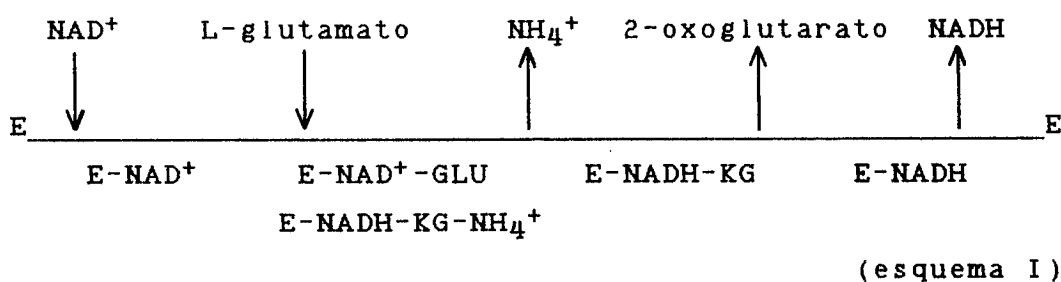
Universitat d'Alicant
 Universidad de Alicante

Figura 35 : Inhibición por hidroxilamina en la aminación reductiva frente a amonio (A), NADH (B) y 2-oxoglutarato (C). Las concentraciones de los sustratos que se mantuvieron fijos en cada caso fueron: 2-oxoglutarato 15mM, NADH 0,023mM y amonio 134 mM.



inhibidor competitivo está después del correspondiente al sustrato variable (Cleland, 1970; Segel, 1975).

Además de los mecanismos al azar de equilibrio rápido y ordenados, las enzimas terreactantes pueden mostrar otros posibles mecanismos (Orsi y Cleland, 1972; Viola y Cleland, 1982). Algunos de ellos han sido considerados con detalle por Fromm (1967), y por Dalziel (1969). Estos pueden describirse como: a) adición al azar de los dos primeros sustratos con la unión ordenada del tercer sustrato (parcial al azar AB); b) adición obligatoria del primer sustrato seguida por la unión al azar de los dos segundos sustratos (parcial al azar BC); y c) unión al azar del primer y tercer sustratos con la adición obligatoria del segundo sustrato (parcial al azar AC). De todos los posibles mecanismos secuenciales se consideraron tres como más probables: el ordenado de estado estacionario (esquema I), azar de equilibrio rápido y parcial al azar BC, que pueden identificarse por estudios de velocidad inicial, inhibición por producto e inhibición competitiva, o inhibición dead-end.



El mecanismo del esquema I, que corresponde a un mecanismo ordenado de estado estacionario (propuesto por Fahien y Strmecki (1969a) para glutamato deshidrogenasa de hígado bovino), predice que el primer producto que aparece debería ser un inhibidor no competitivo con respecto a glutamato y NAD^+ , mientras que el segundo producto debería dar un comportamiento acompetitivo (Segel, 1975); pero con glutamato

deshidrogenasa de *H.halobium* todas las inhibiciones de 2-oxoglutarato observadas fueron no competitivas. Resultados similares obtuvieron Meek y Villafranca (1980) con glutamina sintetasa de *E.coli* y los patrones correspondientes a la inhibición por glutamina frente a glutamato y frente a MgATP (a niveles saturantes de amonio y glutamato, respectivamente), que también fueron no competitivos, sugiriendo varias posibilidades para glutamina: o que se liberara de los complejos centrales al azar con el fosfato, o que formara complejos dead-end con los complejos transitorios enzima-sustrato, o que se uniera a un centro alostérico inhibidor. Carvajal y Kessi (1988) también mostraron resultados de este tipo con octopina deshidrogenasa de *C.concholepas* y los patrones no competitivos obtenidos al actuar como inhibidores arginina o piruvato frente a octopina, compatibles con una eliminación al azar de arginina y piruvato en la oxidación de octopina, o con un mecanismo secuencial ordenado respecto a la liberación de productos y una combinación dead-end del segundo producto (arginina o piruvato) con el complejo E-NAD⁺ y/o la enzima libre. Para NAD-GDH de *H.halobium*, como ya se ha dicho anteriormente, se obtuvieron patrones no competitivos cuando el 2-oxoglutarato actuó como inhibidor frente a NAD⁺ o glutamato a una concentración insaturante del sustrato fijo correspondiente (glutamato 12mM (Fig.28A) ó NAD⁺ 0.25mM (Fig.28B)), persistiendo la inhibición no competitiva cuando se aumentó la concentración del sustrato fijo NAD⁺ a 2.5mM y de glutamato a 120mM (Fig.36A y 36B, respectivamente), resultados que no concuerdan con un mecanismo totalmente ordenado.

Para el mecanismo al azar de equilibrio rápido (Engel y Dalziel, 1969, 1970) la interconversión de los complejos centrales antes de que se liberen los productos es la etapa limitante de la velocidad, y todos los reactantes son capaces de formar complejos productivos con la enzima libre (Engel y Chen, 1975). Si los productos inhibidores se

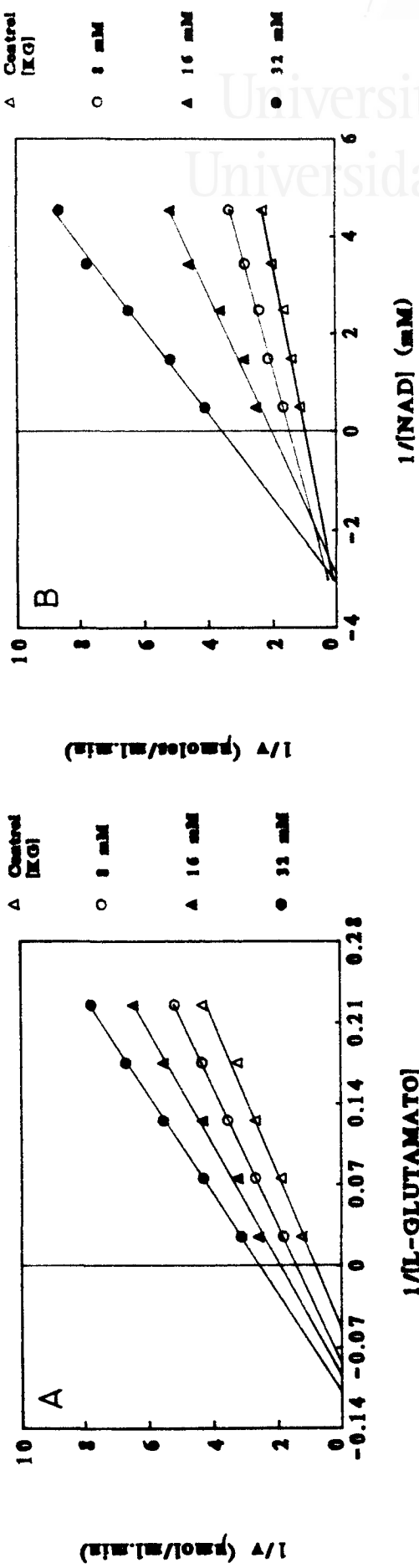


Figura 36 : Inhibición por 2-oxoglutarato en la desaminación oxidativa frente a L-glutamato (A), manteniendo fijo NAD⁺ a una concentración de 2.5mM, y frente a NAD⁺ (B), manteniendo fijo L-glutamato a una concentración de 120mM.

combinan únicamente con la enzima libre, todos los patrones de inhibición deberían ser estrictamente competitivos (Cleland, 1963b). Los resultados experimentales para glutamato deshidrogenasa halofílica son claramente inconsistentes con esta predicción.

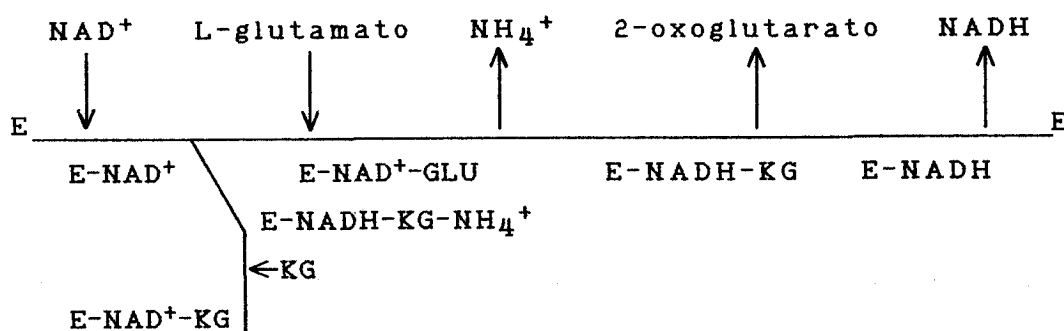
La aparición de comportamientos no competitivos sugiere o que el 2-oxoglutarato se libera de los complejos centrales al azar junto con amonio o que forma complejos dead-end con los complejos enzima-sustrato y/o la enzima libre. De hecho, hay evidencia abundante de que las glutamato deshidrogenasas forman complejos abortivos (Egan y Dalziel, 1971; Cross y col., 1972; di Franco e Iwatsubo, 1972; Engel y Chen, 1975), lo mismo que otras deshidrogenasas (Fromm, 1961; Bradbury y Jakoby, 1971; Wicken y col., 1972), y otras enzimas (Hsu y col., 1967; Barden y col., 1972; Chang y Jones, 1974; Schimerlik y Cleland, 1977; Kiiik y col., 1984; Rao y col., 1987). Por lo tanto, es necesario examinar de nuevo el mecanismo básico (esquema I) considerando la posibilidad de formación de un complejo abortivo. Para ello se analizaron los resultados obtenidos con los inhibidores competitivos en la dirección de aminación. Los tipos de inhibición producidos por glutarato: competitivo con 2-oxoglutarato, no competitivo con amonio y acompetitivo con NADH, están de acuerdo con los mecanismos ordenado y parcial al azar BC (Fromm, 1979). Este comportamiento excluye el mecanismo al azar de equilibrio rápido y el parcial al azar AC, ambos de los cuales deberían dar un comportamiento competitivo y dos no competitivos.

Si la unión de sustratos a la enzima fuera ordenada, uno o más patrones con los inhibidores competitivos debería mostrar inhibición acompetitiva (Fromm, 1967; Rudolph y Fromm, 1969). Los patrones de inhibición obtenidos con hidroxilamina permiten ya una distinción entre las dos posibilidades citadas anteriormente. Su efecto competitivo con amonio y la inhibición acompetitiva con 2-oxoglutarato o

NADH indican que el amonio se añade como el tercer sustrato obligatorio. Este tipo de inhibición desecha el mecanismo parcial al azar BC, ya que la inhibición mostraría de nuevo los mismos tipos que con glutarato: competitivo, no competitivo y acompetitivo (Fromm, 1967, 1979), y no es así. Esto deja como única alternativa al mecanismo ordenado con algunas modificaciones (Fromm, 1979).

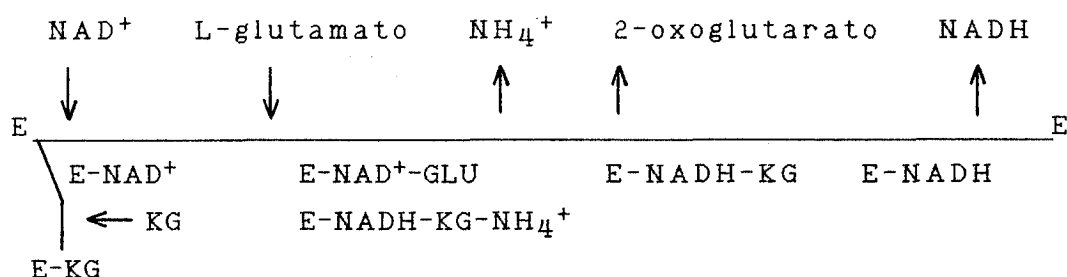
El comportamiento de inhibición no competitiva presentado por 2-oxoglutarato parece necesitar la formación de un complejo dead-end. En ausencia de formación de un complejo dead-end se debería esperar que ocurriera únicamente un efecto de ordenadas; la presencia de un efecto adicional de pendientes implica que 2-oxoglutarato se combina con la enzima libre o con la misma forma de la enzima que glutamato (por ej. E-NAD⁺), como ocurre con isocitrato deshidrogenasa de *Azotobacter vinelandii* (Wicken y col., 1972).

La existencia de un complejo dead-end del tipo E-NAD⁺-2-oxoglutarato (esquema II) debería justificar el comportamiento no competitivo de 2-oxoglutarato con respecto a NAD⁺ (Engel y Chen, 1975) mejor que el acompetitivo predicho. Sin embargo, el patrón no competitivo del 2-oxoglutarato frente a NAD⁺ para glutamato 120mM (Fig. 36B) elimina esta posibilidad, ya que la saturación debería eliminar el efecto de pendientes.



(esquema II)

Las inhibiciones no competitivas frente a todos los sustratos también se observarían si 2-oxoglutarato formase un complejo dead-end con la enzima libre (esquema III).



(esquema III)

La saturación con NAD⁺ debería evitar la formación de E-2-oxoglutarato y eliminar el efecto de la pendiente, pero en los patrones no competitivos de 2-oxoglutarato frente a glutamato el efecto de la pendiente en realidad aumenta cuando la concentración del sustrato fijo NAD⁺ aumenta desde 0.25mM (Fig.28B) a 2.5mM (Fig.36A). Sin embargo, si se supone que NAD⁺ y 2-oxoglutarato se unen a diferentes subcentros de la enzima, saturando con NAD⁺ no se puede evitar completamente la combinación de la enzima libre y el 2-oxoglutarato, y los resultados obtenidos se pueden justificar por el esquema III.

Por lo tanto, se ha propuesto que el mecanismo cinético que sigue la NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* implica una unión ordenada de NAD⁺ y glutamato seguida por la liberación ordenada de amonio, 2-oxoglutarato y NADH, con la formación de un complejo abortivo (E-2-oxoglutarato) (esquema III) (Bonete y col., 1989).

En la deducción del mecanismo han sido determinantes las observaciones siguientes:

(1) Los patrones de velocidad inicial para NAD^+ frente a glutamato, y glutamato frente a NAD^+ son intersectantes.

(2) NADH es un inhibidor competitivo frente a NAD^+ y un inhibidor no competitivo frente a glutamato, indicando que tanto NAD^+ como NADH se unen a la enzima libre.

(3) La hidroxilamina es un inhibidor competitivo frente a amonio, y acompetitivo frente a 2-oxoglutarato y NADH . Por lo tanto, el orden de adición de sustratos en la reacción de aminación es NADH , 2-oxoglutarato y amonio.

(4) El glutarato es un inhibidor competitivo frente a 2-oxoglutarato, acompetitivo frente a NADH y no competitivo frente a amonio, confirmando el orden de unión de los sustratos propuesto en (3).

(5) Los patrones no competitivos de 2-oxoglutarato indican la formación de un complejo abortivo entre la enzima libre y 2-oxoglutarato.

4.4. EFECTO DEL pH, TEMPERATURA Y CONCENTRACION SALINA EN LOS PARAMETROS CINETICOS.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4.4.1.- Efecto del pH en los parámetros cinéticos.

No resulta sorprendente imaginar que el pH influya en la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, dado que los centros activos de las enzimas están compuestos, frecuentemente, por grupos ionizables que se supone que están en la forma iónica más apropiada para mantener la conformación del centro activo, unir a los sustratos o catalizar la reacción. Además, uno o más de los sustratos también pueden contener grupos ionizables y sólo puede unirse a la enzima o experimentar catálisis una forma iónica de ese o esos sustratos. Los valores de pK de los grupos prototrópicos del centro activo se pueden determinar a menudo mediante las representaciones de Dixon, midiendo la dependencia de los logaritmos de las variables cinéticas aparentes $V_{\text{máx}}/K_m$ y $V_{\text{máx}}$ 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 de la enzima libre y sustrato (Dixon y Webb, 1979a).

Muy a menudo, la sensibilidad de la enzima con el pH es una indicación de la existencia de un grupo ionizable en el centro activo de dicha enzima, pero puede ser también medida de algún cambio en la estructura terciaria de la enzima que afecte al centro activo; por esta razón, la sensibilidad de la actividad enzimática con el pH debe interpretarse con cuidado; incluso en el sistema más sencillo los valores

de pK obtenidos son constantes moleculares relativamente complejas (Tipton y Dixon, 1979).

Se analizó el efecto del pH en los parámetros cinéticos de ambas glutamato deshidrogenasas de *H.halobium* en la dirección de aminación reductiva. Para ello se prepararon tampones con una escala de pHs comprendida entre 6.5 y 10.0, a una concentración 0.1M conteniendo NaCl 4M: fosfato sódico de pH 6.5 a 7.5, Tris-HCl con pHs entre 7.5 y 9.0 y glicina-NaOH de pH 9.0 a 10.0. La determinación de las actividades a cada pH se realizó variando la concentración de cada uno de los sustratos y manteniendo fijos los otros dos a concentraciones óptimas, fijando la temperatura de reacción a 40°C.

En la Tabla 19 se muestran los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima NAD-GDH para cada uno de los pHs ensayados. Dichos valores se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación $v = VA / K + A$ mediante el programa de Cleland correspondiente ("Materiales y Métodos"). Se aprecia un máximo de velocidad para NADH a pH 9.0, lo mismo que para 2-oxoglutarato, y en cambio para el amonio, a pH 8.5. Respecto a los valores de las afinidades de los tres sustratos se muestra que el 2-oxoglutarato presenta su máximo a pH 6.5, mientras que NADH tiene su máxima afinidad a pH 8.5 y el amonio a pH 9.0. Se analizaron las representaciones de Dixon para los tres sustratos de la aminación reductiva, ajustándose a las ecuaciones de Cleland (1979) referidas en el apartado de "Materiales y Métodos". Para un mecanismo en el cual el sustrato se une únicamente a la forma correctamente protonada de la enzima, el perfil de V será independiente del pH y los valores de pK para los grupos catalíticos y de unión se verán sólo en los perfiles de V/K (Cleland, 1977; Cook y Cleland, 1981). Pero como se podrá observar en las Figuras, este no es el caso, por lo que la velocidad máxima sí es dependiente del pH (Fig.37). Para el NADH se debe aplicar la ecuación 7, obteniéndose un pK aproximado de 6.9; para el 2-oxoglutarato se ajusta a la ecuación 6 y da valores de pK

TABLA 19

Valores de K_m y $V_{m\max}$ para los tres sustratos de NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* en la reacción de aminación reductiva a diferentes pHs.

pH	2-oxoglutarato			Amonio			NADH		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	
6.5	1.7 ± 0.3	0.098 ± 0.003	407 ± 82	0.26 ± 0.04	--	0.077 ± 0.006			
7.0	2.1 ± 0.4	0.126 ± 0.004	216 ± 94	0.28 ± 0.07	11.7 ± 1.4	0.135 ± 0.002			
7.5	2.4 ± 0.4	0.168 ± 0.006	321 ± 59	0.43 ± 0.06	15.8 ± 1.1	0.180 ± 0.002			
8.0	3.84 ± 0.07	0.223 ± 0.001	--	--	9.4 ± 1.3	0.228 ± 0.003			
8.5	6.0 ± 0.6	0.280 ± 0.009	362 ± 38	0.79 ± 0.06	4.3 ± 1.7	0.248 ± 0.004			
9.0	12.0 ± 1.2	0.38 ± 0.02	213 ± 40	0.57 ± 0.07	11.9 ± 4.0	0.29 ± 0.01			
9.5	14.1 ± 2.9	0.34 ± 0.03	175 ± 66	0.48 ± 0.11	--	--			
10.0	12.3 ± 1.5	0.216 ± 0.012	--	--	--	--			

* Las unidades de K_m son mM, y las de $V_{m\max}$ son U/ml.

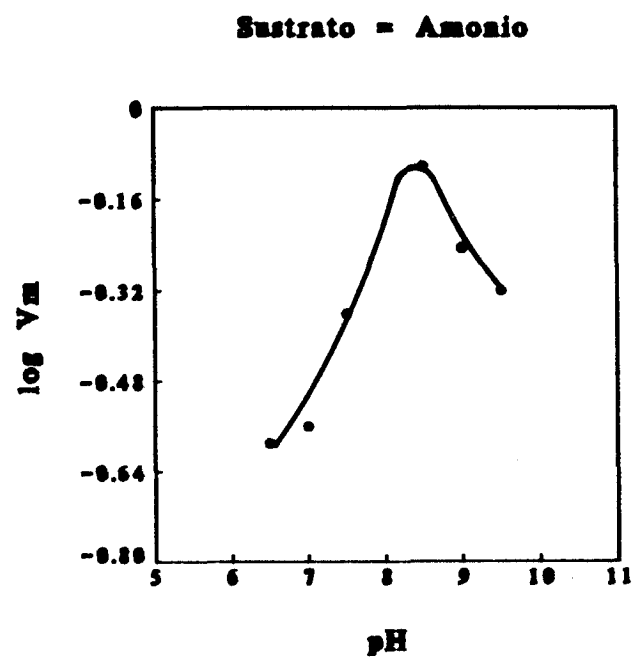
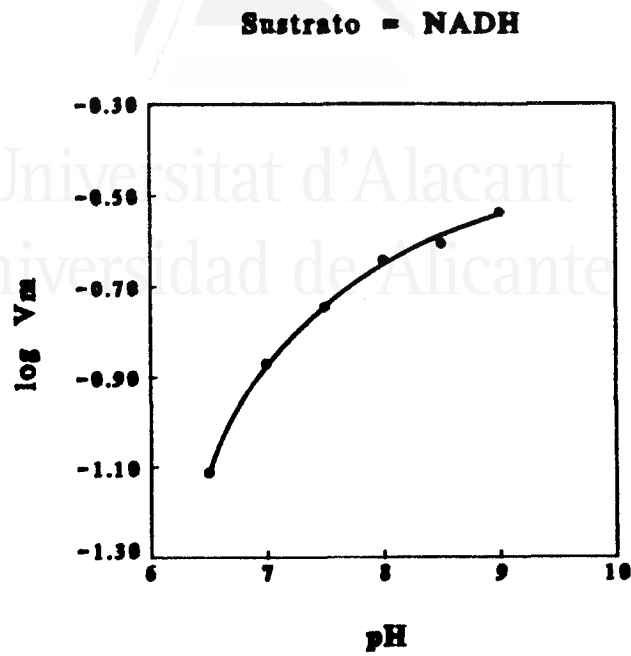
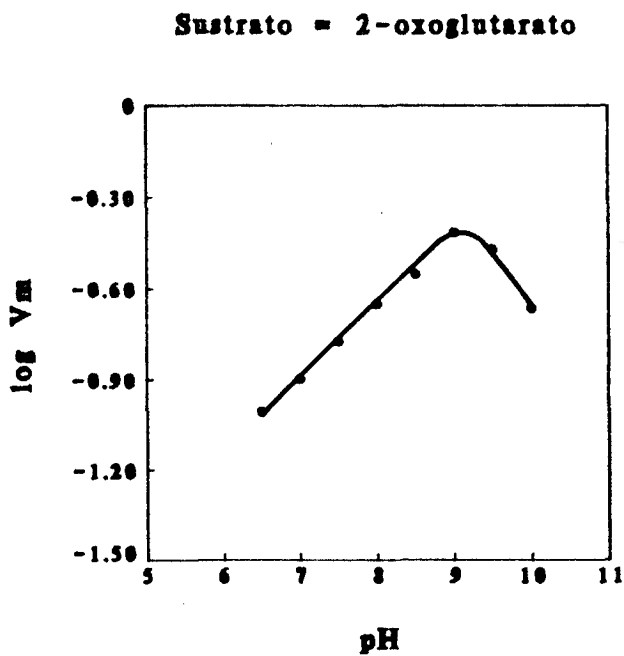


Figura 37 :
Dependencia del $\log V_{max}$ con el pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de H.halobium, en condiciones estándar de medida.

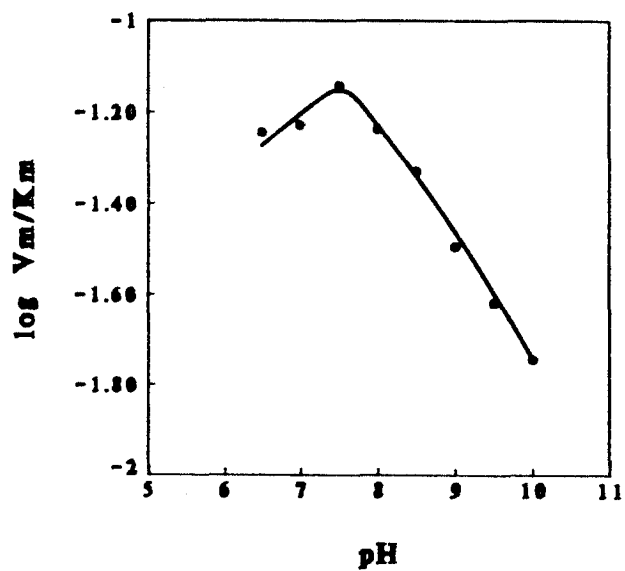
de 6.93 y 10.74, y para el amonio, la curva disminuye por debajo y por encima de un máximo, por lo que también se utiliza la ecuación 6.

El perfil del $\log V/K$ para NADH muestra que la unión de este sustrato a la enzima es dependiente de dos pKs (ec. 6), con valores de 6.96 para pK_a y de 9.35 para pK_b (Fig.38). El correspondiente a 2-oxoglutarato se ajusta mejor a la ecuación 8, disminuyendo para valores altos de pH, y en cambio para el amonio sólo disminuye para valores bajos de pH, obteniendo un valor de pK de 6.98 cuando se ajusta a la ecuación 7.

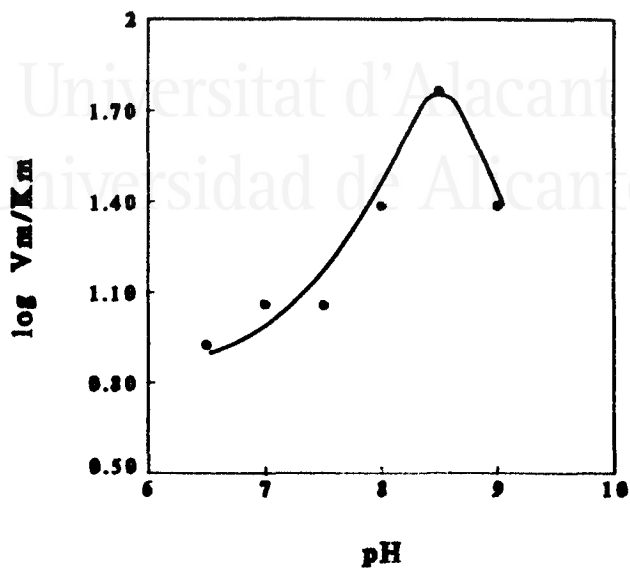
El mecanismo cinético para NAD-GDH de *H.halobium* es predominantemente ordenado con la adición de NADH, 2-oxoglutarato y amonio a la enzima en este orden (Bonete y col., 1989). Como resultado, la forma predominante presente bajo las condiciones de V/K_{NADH} es la enzima libre, mientras que V/K_{KG} representa a E-NADH y V/K_{amonio} a E-NADH-KG.

En la práctica es muy difícil relacionar los pKs determinados experimentalmente con un residuo de aminoácido particular en la molécula de enzima; la explicación de este problema está asociada a dos factores: el entorno del grupo funcional y el efecto de la unión de hidrógeno (Fromm, 1975c; Dixon y Webb, 1979a); además el hecho de que un grupo en la enzima tenga el mismo valor que un grupo químico conocido no demuestra su identidad con ese grupo, ya que otros grupos pueden tener valores similares de pK (Dixon y Webb, 1979a). A pesar de esto, parece probable suponer que un grupo no protonado, seguramente un imidazol de un residuo de histidina, esté implicado en la unión de cualquiera de los tres sustratos de la NAD-GDH de *H.halobium*. Ya que la histidina es el único residuo presente en proteínas con un pK en esta región, puede deducirse que este aminoácido es importante en la combinación del sustrato con la enzima libre así como en la catálisis (Balcom y Fitch, 1970).

Sustrato: 2-oxoglutarato



Sustrato: NADH



Sustrato: Amonio

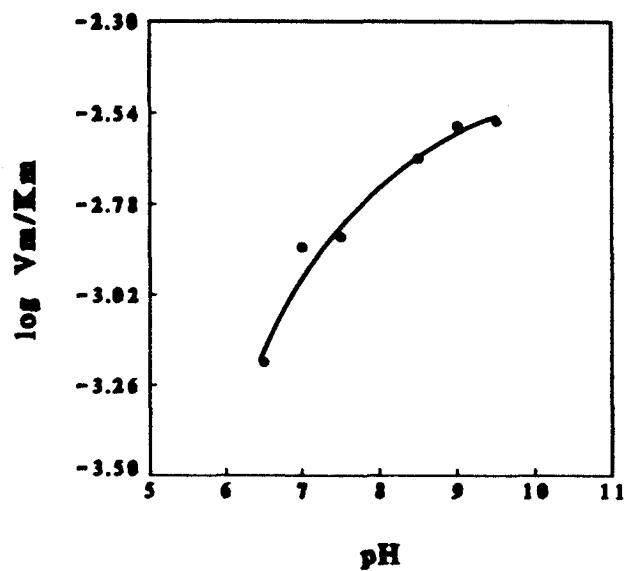


Figura 38 :

Perfil del $\log V_{\max}/K_m$ frente al pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-GDH de *H.halobium*, en condiciones estándar de medida.

Además, también puede estar implicado un grupo protonado, probablemente un ϵ -amino de un residuo de lisina, o bien un hidroxilo fenólico de tirosina o un grupo tiol de una cisteína, puesto que cualquiera de ellos presenta un pK en la región de los pK_D encontrados para los sustratos de la enzima.

En la Tabla 20 se muestran los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la NADP-GDH de *H.halobium* para cada uno de los pHs y ajustándolas a la misma ecuación de Cleland (1979), como en la otra enzima. En el caso de NADPH y 2-oxoglutarato se puede observar la afinidad máxima para un pH de 6.5, mientras que las $V_{m\acute{a}x}$ están a pH 7.5 y 9.0, respectivamente, y para el amonio, el máximo de afinidad está a pH 8.5 mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ la tiene a pH 7.5. Mediante las representaciones de Dixon para los tres sustratos de la aminación reductiva se aprecia una dependencia de la velocidad máxima con el pH (Fig. 39). En los tres casos debe utilizarse la ecuación 6 de "Materiales y Métodos", dada la forma de la curva.

El perfil del $\log V/K$ para amonio muestra que la unión de este sustrato a la enzima es dependiente de dos pKs (ec. 6), con valores de 7.62 y 8.7 para pK_A y pK_B , respectivamente (Fig. 40), mientras que los correspondientes a NADPH y 2-oxoglutarato se ajustan a la ecuación 8, disminuyendo para valores altos de pH. La enzima NADP-GDH de *H.halobium* parece contener un grupo no protonado que está implicado en la unión de cualquiera de los tres sustratos, probablemente un imidazol de un residuo de histidina, como en el caso de la NAD-GDH, pero además también se supone la presencia de un grupo $\alpha-NH_2$ de un aminoácido terminal para la unión del amonio. También puede contener un grupo protonado, probablemente un ϵ -amino de un residuo de lisina,

TABLA 20

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\max}$ de los sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NADP-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar el pH.

pH	2-oxoglutarato			Amonio			NADPH		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_m \pm \Delta V_m$	
6.5	3.3 ± 0.3	0.500 ± 0.014	16.1 ± 1.6	0.32 ± 0.01	46.6 ± 3.6	0.625 ± 0.017			
7.0	4.0 ± 0.6	0.58 ± 0.03	13.7 ± 2.0	0.57 ± 0.0	67.9 ± 8.9	0.82 ± 0.04			
7.5	4.9 ± 0.6	0.73 ± 0.03	15.9 ± 1.4	0.79 ± 0.02	85.7 ± 2.9	1.207 ± 0.018			
8.0	7.8 ± 0.8	0.80 ± 0.03	5.8 ± 0.3	0.571 ± 0.007	108.7 ± 9.7	1.14 ± 0.05			
8.5	10.6 ± 1.1	0.92 ± 0.04	2.6 ± 0.8	0.61 ± 0.02	74.5 ± 8.1	1.08 ± 0.05			
9.0	23.4 ± 2.4	0.98 ± 0.06	8.8 ± 0.5	0.512 ± 0.007	73.2 ± 6.6	0.79 ± 0.03			
9.5	14.7 ± 1.6	0.66 ± 0.04	13.6 ± 1.0	0.47 ± 0.01	92.8 ± 7.4	0.73 ± 0.03			
10.0	46 ± 14	0.70 ± 0.15	53.6 ± 11.7	0.42 ± 0.05	72.7 ± 15.7	0.49 ± 0.04			

Los valores de K_m para 2-oxoglutarato y amonio están expresados en unidades mM; en cambio, los de NADPH están en μM . La actividad catalítica está dada en U/ml.

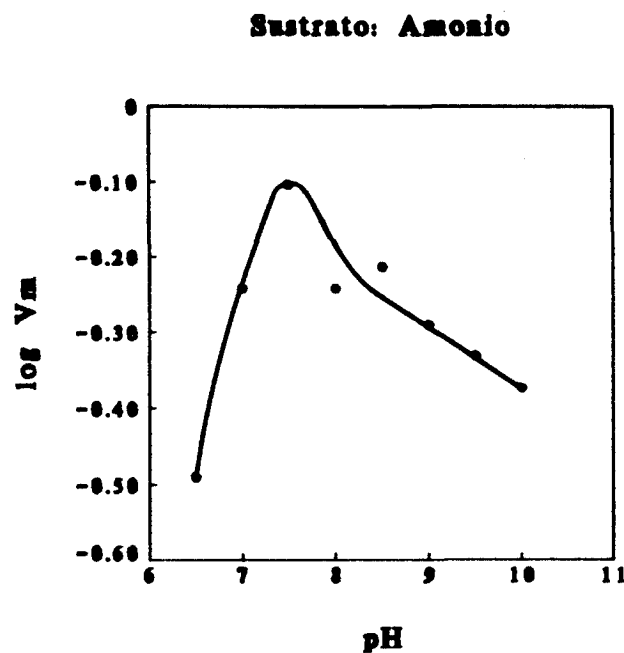
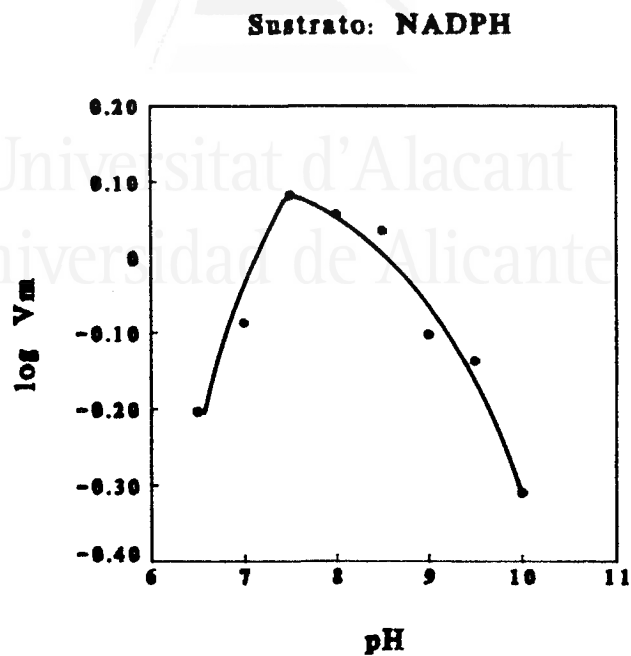
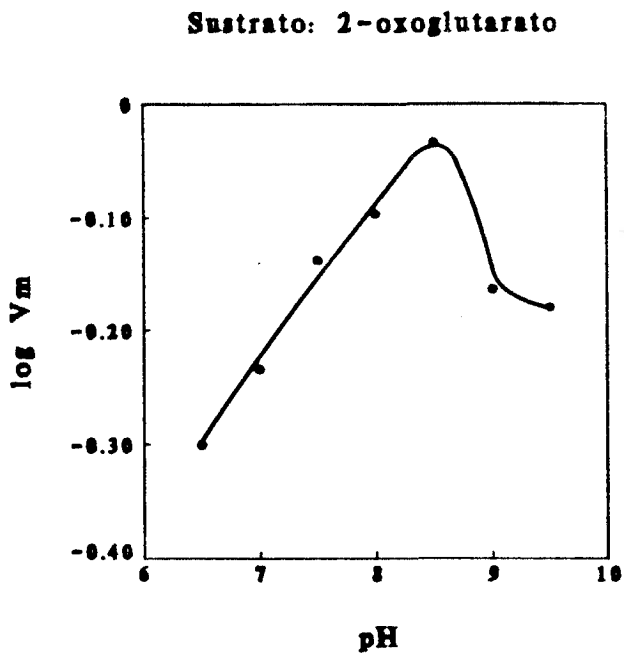
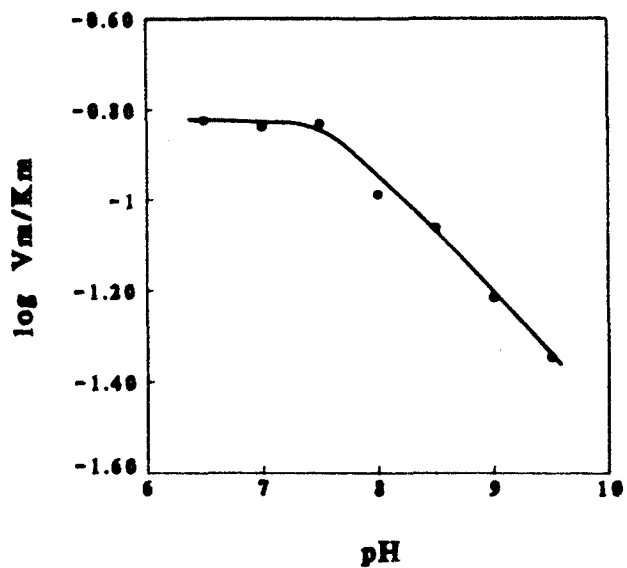


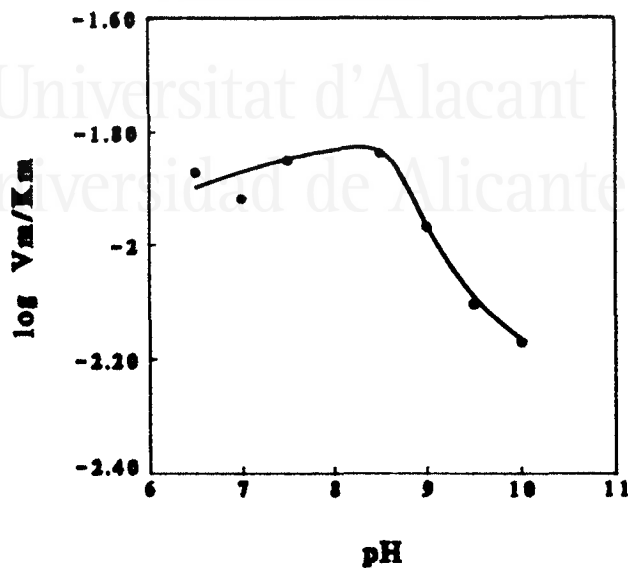
Figura 39 :

Dependencia del $\log V_{\max}$ con el pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NADP-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium*, en condiciones estándar de medida.

Sustrato: 2-oxoglutarato



Sustrato: NADPH



Sustrato: Amonio

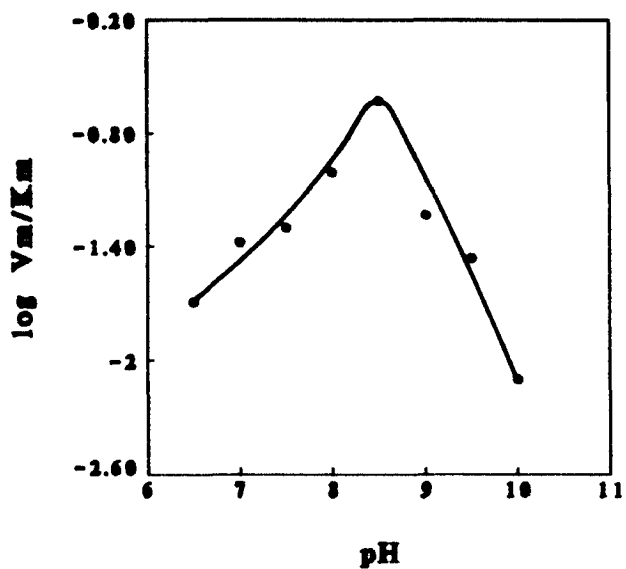


Figura 40 :

Perfil del $\log V_{\max}/K_m$ frente al pH para los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NADP-GDH de *H.halobium*, en condiciones estándar de medida.

para favorecer la unión de cualquiera de los tres sustratos, o un grupo hidroxilo fenólico de tirosina, o un tiol de un residuo de cisteína, igual que ocurre en la NAD-GDH, y la distinción entre un grupo u otro se haría a continuación mediante los calores de ionización de cada uno de ellos. En la Tabla 21 se resumen todos los valores de pK obtenidos para las dos enzimas glutamato deshidrogenasas de *H.halobium*. A la vista de estos datos se pueden comparar ambas enzimas, en donde los valores de las constantes macroscópicas de disociación son parecidos y, por tanto, el tipo de residuos que contienen son prácticamente los mismos.

La razón V/K para un sustrato es la constante de velocidad aparente de primer orden en la reacción del sustrato variable con la enzima cuando el sustrato variable está a niveles próximos a cero, debiendo considerar cuatro factores: 1) La proporción de sustrato en la forma correcta para reaccionar, y esta proporción será dependiente del pH si se requiere una forma concreta de protonación para la unión y/o la actividad. 2) La proporción de enzima en la forma correcta para reaccionar, y esta proporción es dependiente del pH únicamente cuando un estado de protonación de un grupo permite la unión y/o la catálisis. 3) La constante de velocidad bimolecular por combinación de enzima y sustrato. Esta constante, probablemente, no será dependiente del pH. 4) La fracción del complejo de colisión que reacciona para dar productos, opuesto a la disociación, y esta fracción será dependiente del pH siempre que la unión no lo sea (o lo sea parcialmente), pero la reacción catalítica requiere uno o más grupos de la enzima o sustrato que estén en un determinado estado de protonación (Cleland, 1982). Así, en los perfiles de V y V/K se observa prácticamente un mismo pK para los sustratos de la NAD-GDH

TABLA 21

Valores de las constantes macroscópicas de disociación para los tres sustratos de NAD⁻ y NADP-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*. Reacción de aminación.

NAD-GDH		
Parámetro	$pK_a \pm S.E.$	$pK_b \pm S.E.$
V_{NADH}	6.90 ± 0.07	---
V_{2-KG}	6.93 ± 0.19	10.74 ± 0.93
V_{amonio}	6.79 ± 0.26	10.12 ± 0.93
V/K_{NADH}	6.96 ± 0.60	9.35 ± 1.47
V/K_{2-KG}	---	9.55 ± 0.15
V/K_{amonio}	6.98 ± 0.11	---

NADP-GDH		
Parámetro	$pK_a \pm S.E.$	$pK_b \pm S.E.$
V_{NADPH}	6.39 ± 0.16	9.85 ± 0.12
V_{2-KG}	6.45 ± 0.17	10.10 ± 0.45
V_{amonio}	6.40 ± 0.20	10.19 ± 0.23
V/K_{NADPH}	---	10.01 ± 0.16
V/K_{2-KG}	---	9.18 ± 0.15
V/K_{amonio}	7.62 ± 0.36	8.70 ± 0.34

de *H.halobium*, entonces probablemente el punto 4 sea el responsable, mientras que en la NADP-GDH de *H.halobium* sólo se ve en el perfil V y no en el V/K para dos de los sustratos, por lo que es posible que 1 ó 2 sean la causa.

Con la enzima de hígado bovino (Rife y Cleland, 1980a) aparece un pK de 9.05 en el perfil del log V/K para el amonio, mostrando una disminución de la curva por debajo de este valor. Con L-alanina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (Grimshaw y col., 1981) aparece el mismo tipo de curva para ese sustrato. En la NADP-GDH de *H.halobium*, el perfil del log V/K para el amonio da un pK_b de 8.70 con pendiente negativa lo que significa que requiere un grupo protonado para que la reacción se produzca.

En la GDH bovina (Deppert y col., 1973) se encontró un grupo protonado relacionado con la unión del 2-oxoglutarato, atribuyéndoselo a un grupo ε-amino de un residuo de lisina, como en el caso de las dos enzimas de *H.halobium*, en cambio la bovina presentó una particularidad: la unión del NADH fue independiente del pH en la región de pHs ensayada, cosa que no ocurre con las de *H.halobium*. Para la GDH de hígado bovino también se ha encontrado que posee dos lisinas muy reactivas, los residuos 126 y 27 con pKs bajos, de 7.7-7.8 y 8.2, respectivamente (Rife y Cleland, 1980a). Una de ellas se une al C-5 de glutamato o 2-oxoglutarato y la otra actúa como catalizador ácido-base, donando un protón al oxígeno del carbonilo del 2-oxoglutarato durante la adición de amonio, que reacciona como NH₃ para formar carbinolamina. Rife y Cleland han comentado el hecho de que los grupos mostrados en los perfiles de pK para 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 por encima de 10 en E-NADPH.

4.4.2. Efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos.

Un parámetro importante a determinar en el estudio de cualquier sistema enzimático es la temperatura óptima a la que actúa dicho sistema. Una representación de "v" frente a la temperatura, normalmente, muestra un máximo algunas veces llamado "temperatura óptima". La verdadera "temperatura óptima" para un ensayo es la temperatura máxima a la que la enzima presenta una actividad constante en un período de tiempo al menos tan largo como el tiempo del ensayo. Las propiedades referentes al comportamiento térmico de los sistemas enzimáticos son interesantes, pues proporcionan información sobre la naturaleza del proceso catalítico y además marcan las pautas para la adecuada manipulación de tales sistemas enzimáticos (Segel, 1975). En general, cuando una enzima se somete a temperaturas elevadas sufre una pérdida de actividad biológica que es el reflejo de la modificación de la estructura tridimensional bien definida que poseen las enzimas nativas, sin alteración de la secuencia primaria de aminoácidos.

La mayoría de las reacciones químicas aumentan su velocidad al aumentar la temperatura. Un aumento de este parámetro implica una mayor energía cinética para las moléculas reactantes, dando lugar a un mayor número de colisiones eficaces por unidad de tiempo, y la velocidad de una reacción química homogénea depende de la frecuencia de las colisiones entre las moléculas reaccionantes. Pero la frecuencia de las colisiones no se suele igualar a la velocidad de la reacción, ya que sólo una pequeña proporción de las colisiones ocurre con suficiente energía para promover la reacción (Segel, 1975). La energía mínima requerida para que tenga lugar la reacción se denomina "Energía de Activación", pudiéndose aplicar la teoría de Arrhenius en la

que se establece una relación entre la constante de velocidad y la energía de activación del proceso (E_a):

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

siendo: k , la constante de velocidad.

A , una constante de proporcionalidad.

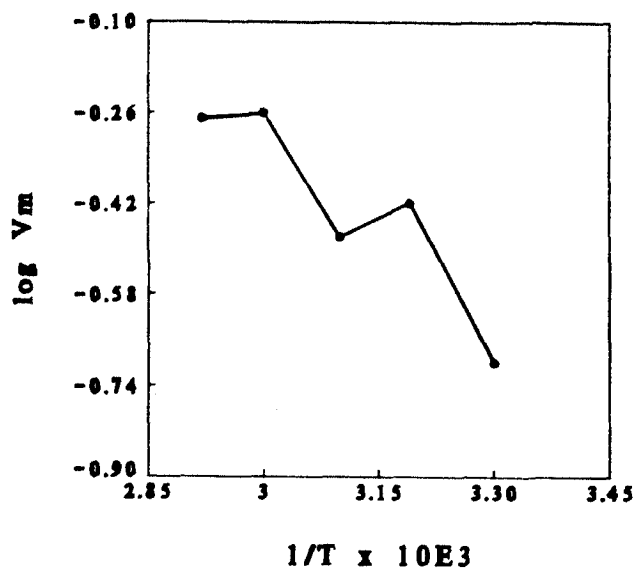
E_a , energía de activación.

Una representación de $\log k$ frente a $1/T$ dará la E_a del paso catalítico. En la práctica puede representarse el $\log V_{m\acute{a}x}$ ya que la $V_{m\acute{a}x}$ de una preparación dada es proporcional a k (Segel, 1975). En este caso se ha representado el $\log V_{m\acute{a}x}$ frente a $1/T$ para cada uno de los sustratos de la aminación reductiva de la NAD-GDH de *H.halobium* (Fig. 41). El rango de temperaturas utilizado fue de 30°C a 70°C. Las concentraciones de los sustratos fueron NADH 0.3mM, 2-oxoglutarato 30mM y amonio 150mM variando, en cada caso, uno de los sustratos y dejando fijos los otros dos. El tampón utilizado fue glicina-NaOH 80mM pH 9.4 conteniendo NaCl 3.2M y AEDT 2.6mM. Las medidas espectrofotométricas se realizaron con ayuda de un sistema de termostatización conectado al espectrofotómetro.

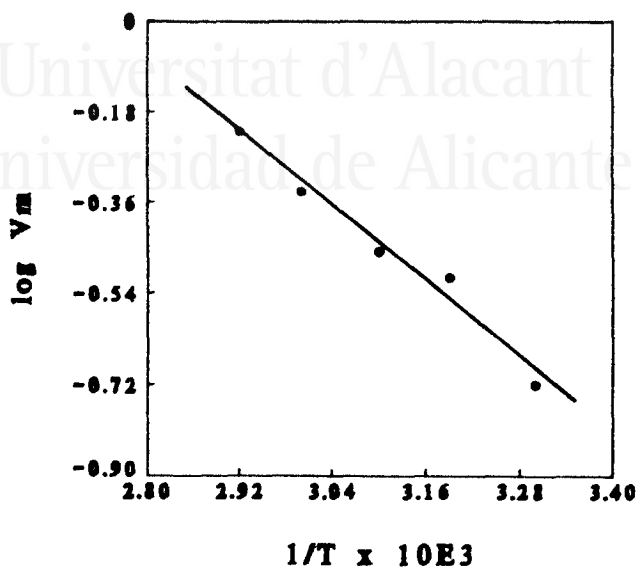
En el caso del NADH se obtuvo una línea recta cuya pendiente dió un valor para E_a de 5.65 Kcal/mol. Los valores de las constantes cinéticas, para los tres sustratos de la GDH halofílica NAD-dependiente en la dirección de aminación, se muestran en la Tabla 22 con sus errores estándar obtenidos mediante la aplicación de la ecuación $v = VA / K+A$ de los programas de Cleland (1979). Tanto el NADH como el 2-oxoglutarato presentaron su afinidad máxima a 50°C; en cambio para el amonio estuvo a 30°C, aunque el valor de K_m



Sustrato: 2-oxoglutarato



Sustrato: NADH



Sustrato: Amonio

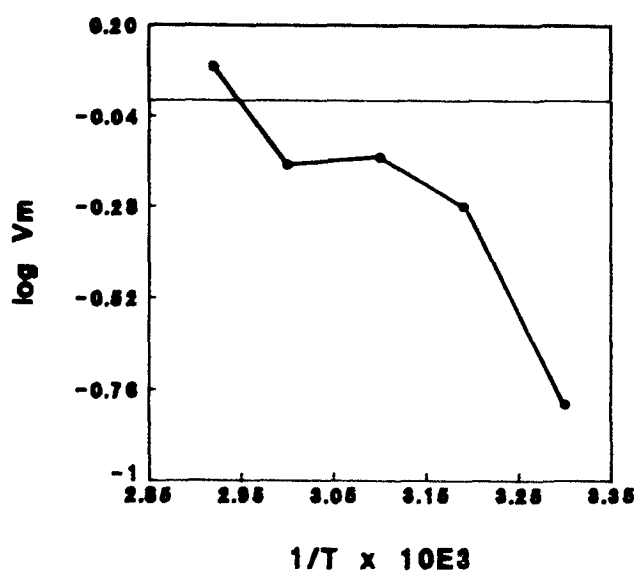


Figura 41 :

Representación de Arrhenius para los tres sustratos de la reacción de aminación catalizada por NAD-GDH de *H.halobium*.

TABLA 22

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la temperatura.

T ^{ra}	2-oxoglutarato			Amonio			NADH		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	
30	8.3 ± 1.1	0.201 ± 0.010	67 ± 36	0.16 ± 0.03	28 ± 4	0.189 ± 0.006			
40	14.2 ± 0.8	0.382 ± 0.011	177 ± 30	0.53 ± 0.05	29 ± 4	0.311 ± 0.010			
50	6.3 ± 0.5	0.334 ± 0.008	213 ± 42	0.70 ± 0.08	13.2 ± 0.5	0.3446 ± 0.0013			
60	17 ± 3	0.55 ± 0.05	186 ± 57	0.67 ± 0.12	22.8 ± 1.8	0.475 ± 0.008			
70	7.2 ± 1.3	0.54 ± 0.03	271 ± 32	1.22 ± 0.10	28 ± 5	0.60 ± 0.02			

Los valores de K_m del 2-oxoglutarato y amonio están expresados en mM; los de NADH, en μM . La temperatura está dada en $^{\circ}C$.

obtenido no puede considerarse demasiado fiable, debido al error estándar tan elevado que aparece. Las representaciones del $\log V_{\text{máx}}$ frente a $1/T$ no fueron lineales en el caso de 2-oxoglutarato y amonio, lo que podría significar que a diferentes temperaturas hay distintas etapas de la reacción que son limitantes (Segel, 1975); o dicho de otra forma, que hay más de una etapa implicada en la unión de la enzima con el sustrato en cuestión (Borgmann y col., 1975). En el caso de NAD-GDH de *H.halobium*, surge además el problema de que los sustratos se ionizan (el 2-oxoglutarato y el amonio) y, por tanto, la temperatura afectará tanto al valor de K_a de éstos como a los grupos del centro activo de la enzima (Segel, 1975).

No hay una correlación entre el aumento de la concentración de sustrato y la temperatura, ya que en el caso de 2-oxoglutarato y NADH, la menor concentración de sustrato para producir el 50% de la $V_{\text{máx}}$ se obtuvo a 50°C, mientras que para amonio fue a 30°C y no aumentó progresivamente al aumentar la temperatura (no se observó ningún orden); Wada y col. (1987) con la fosfodiesterasa de hígado de ternera sí obtuvieron una correlación entre la concentración de sustrato y la temperatura. Estos autores también investigaron los efectos de la temperatura en las transiciones alostéricas y en la actividad catalítica de la enzima estimulada por cGMP, llegando a la conclusión de que las bajas temperaturas promueven transiciones a estados de afinidad bajos. Observaron que K_a (constante de activación) aparente para el cGMP disminuía al hacerlo la temperatura, con lo cual la afinidad del efector aumentaba al bajar dicha temperatura. También observaron que la actividad catalítica ($V_{\text{máx}}$) y K_m aparente para cAMP y la hidrólisis de cGMP aumentaban con la temperatura, y lo mismo ocurría con el coeficiente de Hill.

Cuando se representaron los $\log K_m$ frente a $1/T$ no se obtuvo un comportamiento lineal con ninguno de los tres sustratos, lo que indica, según Laidler y Peterman (1979) que las K_m están controladas por más de una constante de velocidad.

A partir del valor de E_a obtenido se pueden calcular los valores de la entalpía (ΔH^*), la entropía (ΔS^*) y la energía libre (ΔG^*) del estado activado, según las ecuaciones:

$$\Delta H^* = E_a - RT$$

$$\Delta G^* = RT [\ln k_B T/h - \ln k]$$

$$T\Delta S^* = \Delta H^* - \Delta G^*$$

siendo: k_B = cte. de Boltzmann = 1.38×10^{-16} erg.K⁻¹.

h = cte. de Planck = 6.624×10^{-27} erg.sg.

R = cte. de los gases = 1.987 cal.K⁻¹.mol⁻¹.

A una temperatura de 40°C, los valores obtenidos para la NAD-GDH de *H.halobium* fueron: 5.03 Kcal/mol para ΔH^* , 18.93 ± 0.17 Kcal/mol para ΔG^* y -44.4 ± 0.5 cal/molK⁻¹ para ΔS^* . También se obtuvo el valor del llamado "coeficiente de temperatura", Q_{10} , que es el factor por el que la constante de velocidad aumenta al aumentar 10°C la temperatura, siendo 1.33 para esta enzima.

Cuando hay más de un sustrato los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m no siguen necesariamente la ley de Arrhenius, ya que son combinaciones de las constantes de velocidad individuales, pero dicha ley puede aplicarse si predomina alguna de las constantes de velocidad (Laidler y Peterman, 1979). En la enzima NAD-GDH halofílica sólo se cumple para la coenzima, y

ésta es la razón de que se haya obtenido la E_a a partir de ella. En la bibliografía no se han encontrado estudios del efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de glutamato deshidrogenasas, por lo que no se puede hacer comparaciones con la NAD-GDH de *H.halobium*.

4.4.3. Efecto de las sales en los parámetros cinéticos.

Se realizaron una serie de estudios con NAD-GDH de *H.halobium* variando la concentración y el catión de las sales presentes en el medio de reacción, utilizando NaCl y KCl, con el fin de observar el comportamiento de los sustratos frente a dichas sales en las distintas concentraciones y las variaciones de sus parámetros cinéticos.

Cuando se trabajó en la aminación reductiva se utilizó tampón glicina-NaOH 0.1M de pH 9.4 conteniendo AEDT 3.25mM y la sal correspondiente. Los sustratos se variaron de forma que dos de ellos se mantuvieron fijos mientras que el tercero osciló en un rango dado de concentraciones. Dicho rango fue 2mM-30mM para 2-oxoglutarato; 25mM-200mM para amonio; y 0.94µM-30.0µM para NADH, siendo las concentraciones de los sustratos fijos correspondientes en cada caso: 0.3mM para NADH, 105mM para amonio, y 20mM para 2-oxoglutarato. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 23 para NaCl y en las Tablas 24A-24C para KCl. En ellas se puede observar que el sustrato 2-oxoglutarato aumentó su $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de NaCl, mientras que en KCl presentó su valor máximo a una concentración de 1.5M; la afinidad, en cambio, disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl, y en KCl este sustrato tuvo valores de afinidad semejantes en todas las concentraciones. Comparando los datos obtenidos

TABLA 23

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de los tres sustratos de la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de NaCl.

[NaCl]	2-oxoglutarato			Amonio			NADH		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	
0.25	2.1 ± 0.3	0.67 ± 0.03	132 ± 13	1.49 ± 0.08	8.5 ± 1.2	0.688 ± 0.007			
0.75	3.7 ± 0.3	0.72 ± 0.02	135 ± 21	1.48 ± 0.12	15.1 ± 1.5	0.814 ± 0.011			
1.50	4.9 ± 1.3	0.79 ± 0.07	271 ± 36	2.03 ± 0.18	12.9 ± 1.4	0.654 ± 0.007			
2.00	7.4 ± 1.2	0.97 ± 0.06	208 ± 33	1.80 ± 0.17	23 ± 4	0.86 ± 0.03			
2.50	7.6 ± 0.6	1.10 ± 0.03	181 ± 33	1.58 ± 0.16	23 ± 3	0.859 ± 0.018			
3.00	8.5 ± 0.6	1.21 ± 0.03	195 ± 23	2.11 ± 0.15	33 ± 5	1.00 ± 0.03			
3.50	8.5 ± 0.6	1.27 ± 0.10	164 ± 26	1.86 ± 0.16	34 ± 4	1.09 ± 0.03			
4.00	13.0 ± 4.0	1.50 ± 0.20	257 ± 51	2.8 ± 0.3	43 ± 9	1.44 ± 0.09			

Unidades de K_m : mM para 2-oxoglutarato y amonio, μM para NADH. Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml. Unidades de [NaCl] : M.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

TABLA 24A

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ del sustrato 2-oxoglutarato en la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de KCl.

[KCl] (M)	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$
0.75	4.8 ± 1.2	0.88 ± 0.09
1.50	5.4 ± 0.9	1.04 ± 0.07
2.00	3.5 ± 1.1	0.66 ± 0.06
2.50	2.4 ± 0.4	0.66 ± 0.02
3.00	2.3 ± 0.3	0.543 ± 0.014
3.50	4.0 ± 0.3	0.482 ± 0.012
4.00	2.5 ± 0.3	0.497 ± 0.014

Unidades de K_m : mM. Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml.



Universitat d'Alacant

Universidad de Alicante

TABLA 24B

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ del sustrato amonio en la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de KCl.

[KCl] (M)	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$
0.75	204 \pm 27	2.09 \pm 0.16
1.50	160 \pm 18	1.79 \pm 0.11
2.00	313 \pm 113	2.0 \pm 0.5
2.50	606 \pm 184	3.6 \pm 0.9
3.00	268 \pm 18	1.71 \pm 0.07
3.50	262 \pm 27	1.93 \pm 0.13
4.00	417 \pm 61	2.5 \pm 0.3

Unidades de K_m : mM.Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml.



Universitat d'Alacant

TABLA 24C

Universidad de Alicante

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ del sustrato NADH en la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de KCl.

[KCl] (M)	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$
0.25	30 ± 3	2.26 ± 0.14
0.35	38 ± 8	4.3 ± 0.8
0.55	90 ± 50	8.2 ± 3.6
0.75	6.8 ± 0.8	2.08 ± 0.11

Unidades de K_m : μM .Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml.

con ambas sales, se observó que las afinidades fueron más pequeñas en NaCl que en KCl. Por otro lado, el amonio consiguió su máxima afinidad a 0.25M-0.75M de NaCl, mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ se obtuvo a 4M de esta sal. Con KCl, la $V_{m\acute{a}x}$ estuvo a 2.5M, mientras que la afinidad más elevada para este sustrato fue a 1.5M de sal. Volviendo a comparar ambas sales, las afinidades del amonio en KCl fueron menores que en NaCl. Para NADH, las actividades catalíticas con NaCl fueron inferiores a las correspondientes con KCl (en todos los casos); a concentraciones de KCl mayores de 0.75M presentó un comportamiento distinto a los demás sustratos, encontrándose una curva cóncava hacia abajo en la representación de Scatchard, como se puede apreciar en la Fig.42, mientras que a concentraciones menores, la representación fue una línea recta (Fig.43). A la vista estos resultados se puede decir que la unión del NADH presenta cooperatividad positiva a concentraciones de KCl 1M, 2M y 3M, mientras que para concentraciones pequeñas la cooperatividad desaparece. Existen, por tanto, interacciones heterotrópicas positivas entre la coenzima y KCl. Estas interacciones pueden provocar cambios conformacionales en la proteína (Neet, 1980). Los efectores alostéricos poseen centros de unión distintos (y a veces distantes) del centro activo, por lo que la unión de uno de estos efectores al centro alostérico altera las propiedades catalíticas del centro activo.

Según el modelo concertado de Monod y col. (1965), podría considerarse que la enzima presenta dos conformaciones diferentes que están en equilibrio en presencia de concentraciones elevadas de KCl, y dicho equilibrio se desplaza hacia el estado de unión más favorecido, de forma que se puedan asociar más moléculas de NADH. Si se considera el modelo secuencial de Koshland y col. (1966), el KCl puede unirse a una conformación A o a una B y estabilizar o desestabilizar la conformación de unión preferida por el ligando (el NADH). Ya que los cambios conformacionales en



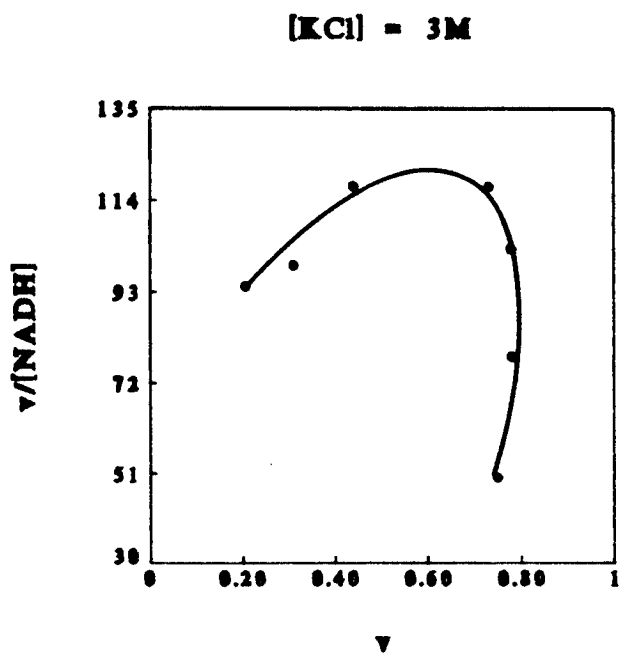
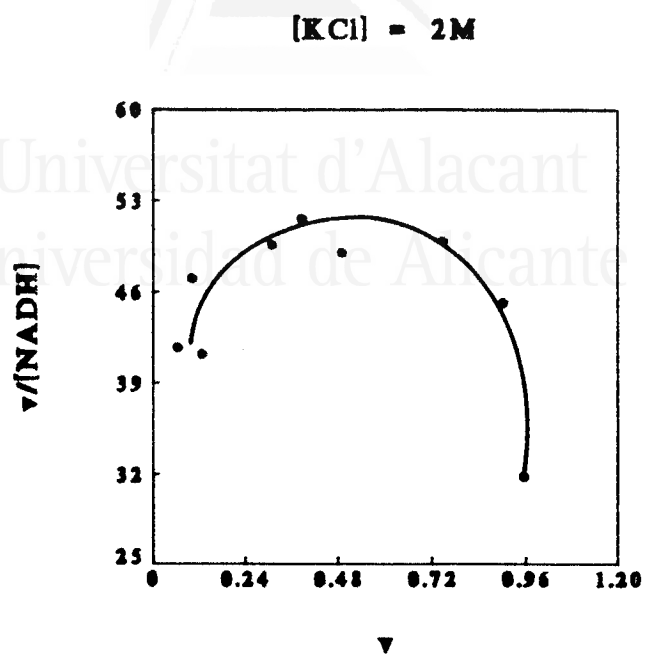
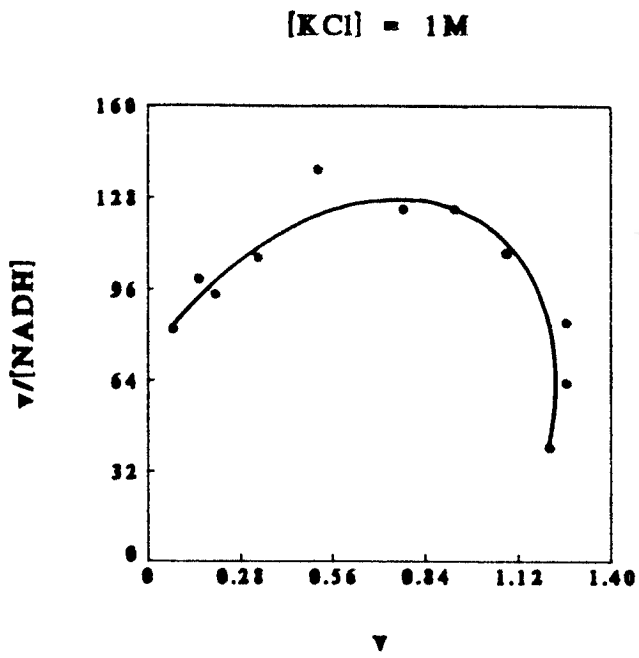


Figura 42 :

Representación de Scatchard para el sustrato NADH de la reacción de aminación catalizada por NAD-GDH de *H. halobium*, a tres concentraciones de KCl, indicando cooperatividad positiva.



[KCl] = 0.25M
Sustrato variable = NADH

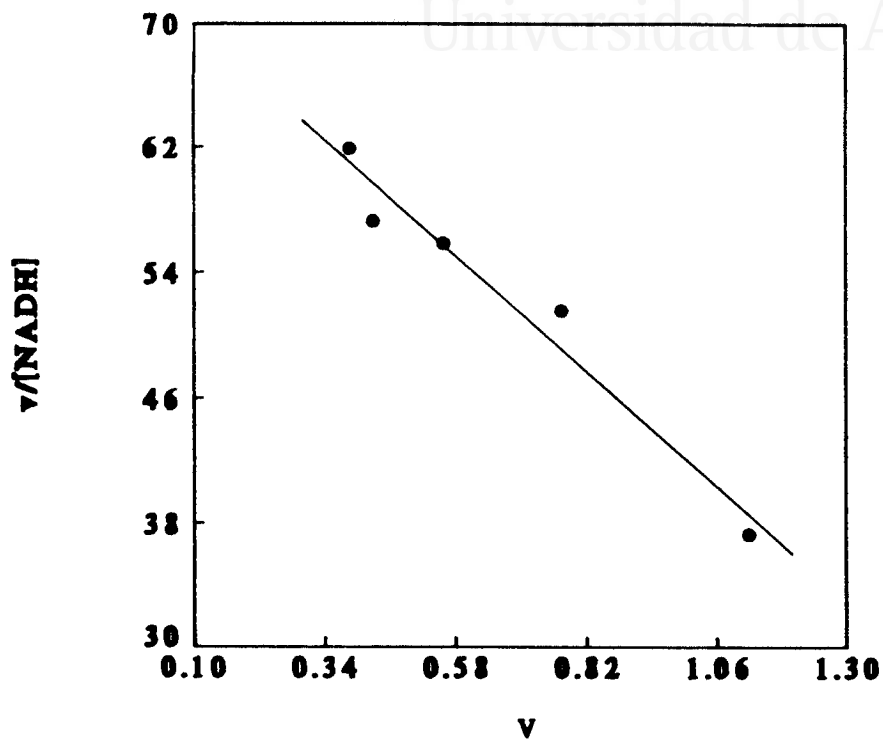


Figura 43 : Representación de Scatchard para el sustrato NADH de la aminación reductiva catalizada por la enzima NAD-GDH *H.halobium* a una concentración de KCl 0.25M, observándose ausencia de cooperatividad.

este modelo se consideran inducidos por el ligando, el efector puede inducir a una nueva conformación con propiedades diferentes que las obtenidas por el sustrato solo. Esta posibilidad da lugar a múltiples consecuencias que son suficientes para explicar la mayoría de las observaciones, pero no son fácilmente analizables en términos de consideraciones moleculares sencillas.

Malato deshidrogenasa de *H.halobium* (Cadenas, 1985; Cano, 1987) presentó cooperatividad negativa al variar el sustrato oxalacetato, a una concentración 2M de KCl, pero al disminuir a 1M esta cooperatividad desapareció. Con alanina deshidrogenasa de *H.halobium* (Sahagún, 1988) también se obtuvo este comportamiento, pero de forma distinta: en la dirección de desaminación oxidativa, cuando el medio de reacción contenía KCl 1.5M hubo cooperatividad positiva; en cambio, a 3.6M desapareció.

Como se puede apreciar en las Tablas, para una concentración salina determinada los valores de $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos con los tres sustratos de la aminación catalizada por NAD-GDH de *H.halobium* no fueron iguales, por lo que dichos valores de $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos no pudieron ser tratados como verdaderos valores de $V_{m\acute{a}x}$, sino sólo como valores aparentes, indicando que las concentraciones de los sustratos fijos no fueron completamente saturantes (Aitken y col., 1970).

En el sentido de desaminación oxidativa para la misma enzima se utilizó tampón glicina-NaOH 0.1M de pH 9.0 conteniendo AEDT 3.25mM y la sal correspondiente. Para realizar estos ensayos se mantuvo NAD^+ a una concentración fija de 3mM mientras que el glutamato se varió en un rango dado de concentraciones, de 5mM a 50mM. Por otro lado, también se mantuvo fijo el glutamato a una concentración de 50mM variando NAD^+ en un rango de concentraciones comprendido entre 0.6mM y 4.5mM. Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos se muestran en las Tablas 25 y 26 con NaCl y KCl,

TABLA 25

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de los tres sustratos de la reacción de desaminación oxidativa catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de NaCl.

[NaCl] (M)	L-glutamato			NAD ⁺		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$		$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	
0.25	9.40 ± 1.15	0.50 ± 0.02		0.62 ± 0.07	0.488 ± 0.014	
0.50	9.6 ± 1.0	0.525 ± 0.019		0.38 ± 0.07	0.460 ± 0.016	
0.75	9.4 ± 1.4	0.51 ± 0.02		0.45 ± 0.05	0.485 ± 0.011	
1.00	3.6 ± 0.4	0.40 ± 0.01		0.24 ± 0.04	0.353 ± 0.009	
1.50	11.7 ± 1.3	0.396 ± 0.015		0.46 ± 0.06	0.389 ± 0.011	
2.00	17.3 ± 1.3	0.387 ± 0.012		0.62 ± 0.06	0.371 ± 0.009	
2.50	22.7 ± 3.0	0.45 ± 0.03		0.51 ± 0.07	0.335 ± 0.011	

Unidades de K_m para ambos sustratos : mM. Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml.

TABLA 26

Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de los tres sustratos de la reacción de desaminación oxidativa catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium* al variar la concentración de KCl.

[KCl](M)	L-glutamato			NAD ⁺		
	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$	$K_m \pm \Delta K_m$	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta V_{m\acute{a}x}$		
0.50	19.8 ± 1.9	0.85 ± 0.04	0.78 ± 0.07	0.91 ± 0.03		
0.70	11.6 ± 1.3	0.75 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.532 ± 0.012		
0.90	10.7 ± 0.9	0.67 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.519 ± 0.007		
1.40	10.3 ± 0.6	0.591 ± 0.012	0.32 ± 0.02	0.495 ± 0.007		
1.80	9.0 ± 0.6	0.529 ± 0.012	0.39 ± 0.04	0.462 ± 0.011		
2.20	8.3 ± 0.7	0.481 ± 0.011	0.33 ± 0.04	0.309 ± 0.006		

Unidades de K_m para ambos sustratos : mM. Unidades de $V_{m\acute{a}x}$: U/ml.

respectivamente. Para el glutamato las variaciones de sus afinidades pasaron por dos tramos en NaCl; en el primero de ellos, de 0.25M a 0.75M se mantuvo el mismo valor; a 1M se obtuvo la mayor afinidad y a continuación disminuyó al aumentar la concentración salina. En KCl aumentó la afinidad a medida que lo hacía la concentración de sal, pero las variaciones entre los distintos valores fueron muy pequeñas. Respecto a la $V_{m\acute{a}x}$ se pudo observar el mismo tipo de variación en NaCl que en KCl, disminuyendo al aumentar la concentración salina y siendo alrededor de 0.2-0.3 unidades más elevadas en la segunda sal que en la primera.

Tanto la afinidad como la $V_{m\acute{a}x}$ aparente para el NAD^+ no presentaron un comportamiento uniforme en NaCl. En KCl, la afinidad por NAD^+ fue similar en todas las concentraciones ensayadas, excepto a 0.5M, que presentó una menor afinidad. Por el contrario, la $V_{m\acute{a}x}$ disminuyó al aumentar la sal y con valores algo más elevados que en NaCl. En esta dirección no se observó, en ningún caso, cooperatividad de ningún tipo.

El mejor activador para citrato sintasa de *H.cutirubrum* (Higa y Cazzulo, 1975), entre una serie de sales probadas, fue el KCl, y este efecto se observó con la enzima en diferentes grados de pureza, desde el extracto crudo hasta el estado más purificado. Con la catalasa de la misma fuente (Lanyi y Stevenson, 1969) ocurrió igual; entre varias sales de catión monovalente estudiadas, el KCl fue el que presentó mayor activación. En concentraciones equimolares, Dundas (1972) encontró que la ornitina carbamoiltransferasa de *H.salinarium* presentó actividades más elevadas en presencia de KCl que de NaCl. Isocitrato deshidrogenasa de *H.cutirubrum* fue mejor activada con NaCl que con otras sales probadas (Hubbard y Miller, 1969; Higa y col., 1974) y por otro lado, glicerol deshidrogenasa, enzima málica (NADP-dependiente) y citrato sintasa, todas de *H.cutirubrum*, fueron máximamente activadas por KCl (Higa y col., 1974). En cambio, según se puede observar en las Tablas anteriores, la

NAD-GDH de *H.halobium* fue prácticamente igual de sensible al catión Na^+ que al K^+ , tanto en la aminación reductiva como en la desaminación oxidativa. En el caso de alanina deshidrogenasa de *H.salinarium* (Keradjopoulos y Holldorf, 1979) se comprobó que el efecto del NaCl y KCl en la aminación reductiva de piruvato era prácticamente el mismo, como le ocurrió a NAD-GDH de *H.halobium*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5. CONCLUSIONES.

5. CONCLUSIONES.

1. Se han aislado y purificado las actividades NAD- y NADP-glutamato deshidrogenasas de *H.halobium* 36014 (mutante incoloro). Dichas actividades no corresponden a una misma proteína con diferentes estados de agregación, sino a dos enzimas distintas con propiedades diferentes.

2. Las propiedades características de ambas enzimas son:

	<u>NAD-GDH</u>	<u>NADP-GDH</u>
* pH:	Tris-HCl/Gly-NaOH	Tris-HCl
Aminación	9.0 / 9.4	8.0 - 8.5
Desaminación	8.0 / 9.0	10.0
* Temperatura:		
Aminación	70°C	70°C
Desaminación	70°C	- -
* [sal]:	NaCl / KCl	NaCl / KCl
Aminación	3.2M / 0.8M	1.6M / 1.6M
Desaminación	1.0M / 0.4M	- -
* Peso molecular: (daltons)	148000	215000

3. La NAD-GDH es activada por aminoácidos. A dicha enzima se le asigna un papel catabólico mientras que a la NADP-GDH, un papel anabólico.

4. La estabilidad es diferente para ambas enzimas dependiendo del parámetro que se considere:

Con el pH, las dos presentan la misma estabilidad; con la temperatura, NAD-GDH es más estable que NADP-GDH; y con la concentración salina, NADP-GDH es más estable que NAD-GDH al disminuir dicha concentración de NaCl.

5. Los estudios de fluorescencia realizados con ambas enzimas indican la presencia de residuos de tirosina y de triptófano. La NADP-GDH en forma inactiva presenta una mayor exposición de dichos residuos.

6. El glutarato y la hidroxilamina son inhibidores competitivos de 2-oxoglutarato y amonio, respectivamente.

7. El mecanismo cinético para la reacción de desaminación oxidativa catalizada por NAD-glutamato deshidrogenasa de *H.halobium* es ordenado, con la adición en primer lugar de NAD⁺ seguido por L-glutamato, obtenido mediante el estudio de velocidades iniciales, inhibición por producto e inhibición por análogos de sustrato.

8. El mecanismo cinético para la reacción de aminación reductiva catalizada por NAD-GDH es una unión ordenada de NADH, 2-oxoglutarato y amonio.

9. Los estudios de inhibición por producto han revelado la presencia de un complejo abortivo en la reacción de desaminación catalizada por NAD-GDH: E-2-oxoglutarato.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. BIBLIOGRAFIA.

6. BIBLIOGRAFIA.

AITKEN, D.M. y BROWN, A.D. (1969) Citrate and glyoxylate cycles in the halophil, *Halobacterium salinarium*. *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 351-354.

AITKEN, D.M. y BROWN, A.D. (1972) Properties of halophil nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase. True Michaelis constants, reaction mechanisms and molecular weights. *Biochem. J.* **130**, 645-662.

AITKEN, D.M., WICKEN, A.J. y BROWN, A.D. (1970) Properties of a halophil NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochem. J.* **116**, 125-134.

ALBERTY, R.A. (1958) On the determination of rate constants for coenzyme mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1777-1782

ALEX, S. y BELL, J.E. (1980) Dual coenzyme specificity of bovine glutamate dehydrogenase. The role of negative cooperativity. *Biochem. J.* **191**, 299-304.

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**, 5912-5923.

ASHBY, B., WOOTTON, J.C. y FINCHAM, J.R.S. (1974) Slow conformational changes of a *Neurospora* glutamate dehydrogenase studied by protein fluorescence. *Biochem. J.* **143**, 317-329.

ATKINSON, D. (1960) Regulation of enzyme activity. *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 85-124.

AUER, H.E. y DOTY, P. (1966) The conformational stability of α -helical nonpolar polypeptides in solution. *Biochemistry* **5**, 1716-1725.

AUSTEN, B.M., HABERLAND, M.E., NYC, J.F. y SMITH, E.L. (1977) NAD-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. IV. The COOH-terminal 669 residues of the peptide chain; comparison with other glutamate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **252**, 8142-8149.

AUSTEN, B.M. y SMITH, E.L. (1976) Identification of a functional arginine residue involved in coenzyme binding by the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 251, 5835-5837.

BACHOFEN, R. y NEERACHER, H. (1968) Glutamat dehydrogenase im photosynthetischen bakterium *Rhodospirillum rubrum*. *Archiv. fur Mikrobiologie* 60, 235-245.

BAILEY, J., BELL, E.T. y BELL, J.E. (1982) Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. The effects of pH and ADP. *J. Biol. Chem.* 257, 5579-5583.

BALCOM, J.K. y FITCH, N.M. (1970) A method for the kinetic analysis of progress curves using horse serum cholinesterase as a model case. *J. Biol. Chem.* 245, 1637-1647.

BANERJEE, A., LEVY, H.R., LEVY, G.C., LIMUTI, C., GOLDSTEIN, B.M. y BELL, J.E. (1987) A transfer nuclear overhauser effect study of coenzyme binding to distinct sites in binary and ternary complexes in glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* 26, 8443-8450.

BARDEN, R.E., FUNG, C-H, UTTER, M.F. y SCRUTTON, M.C. (1972) Pyruvate carboxylase from chicken liver. Steady-state kinetic studies indicate a "two-site" Ping-Pong mechanism. *J. Biol. Chem.* 247, 1323-1333.

BARRATT, R.W. y STRICKLAND, W.N. (1963) Purification and characterization of a TPN-specific glutamic acid dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 102, 66-76.

BAXTER, R.M. (1959) An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* 5, 47-57.

BAXTER, R.M. y GIBBONS, N.E. (1954) The glycerol dehydrogenases of *Pseudomonas salinaria*, *Vibrio costicolus* and *E.coli* in relation to bacterial halophilism. *Can. J. Biochem. Physiol.* 32, 206-217.

BAXTER, R.M. y **GIBBONS, N.E.** (1956) Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of *Micrococcus halodenitrificans* and *Pseudomonas salinaria*. *Can. J. Microbiol.* **2**, 599-606.

BAYLEY, P.M. y **O'NEILL, K.T.J.** (1980) The binding of oxidised coenzyme to bovine liver glutamate dehydrogenase studied by circular-difference spectroscopy. *Eur.J. Biochem.* **112**, 521-531.

BELL, E.T. y **BELL, J.E.** (1984) Catalytic activity of bovine glutamate dehydrogenase requires a hexamer structure. *Biochem. J.* **217**, 327-330.

BELL, J.E. y **DALZIEL, K.** (1973) A conformational transition of the oligomer of glutamate dehydrogenase induced by half-saturation with NAD^+ or NADP^+ . *Biochim. Biophys. Acta* **309**, 237-242.

BELL, E.T., LIMUTI, C., RENZ, C.L. y **BELL, J.E.** (1985) Negative co-operativity in glutamate dehydrogenase. Involvement of the 2-position in glutamate in the induction of conformational changes. *Biochem. J.* **225**, 209-217.

BELLION, E. y **TAN, F.** (1984) NADP-dependent glutamate dehydrogenase from a facultative methylotroph. *Pseudomonas* sp. strain AM1. *J. Bacteriol.* **157**, 435-439.

BELLIVEAU, J.W. y **LANYI, J.K.** (1977) Analogies between respiration and a light-driven proton pump as sources of energy for active glutamate transport in *Halobacterium halobium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **178**, 308-314.

BELLIVEAU, J.W. y **LANYI, J.K.** (1978) Calcium transport in *Halobacterium halobium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 98-105.

BERNARD, T. y **GOAS, G.** (1979) Glutamato deshidrogenasas du Lichen *Lobaria laetevirens* (Lightf.) Zahlbr. caractéristiques de l'enzyme du Champignon. *Physiol. Vég.* **17**, 535-546.

BERNARDI, G. y **KAWASAKI, T.** (1968) Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 301-310.

BISHOP, S.H., KLOTZ, A., DROLET, L.L., SMULLIN, D.H. y HOFFMAN, R.J. (1978) NADP-specific glutamate dehydrogenase in *Metridium senile* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **61B**, 185-187.

BITENSKY, M.W., YIELDING, K.L. y TOMKINS, G.M. (1965) The effect of allosteric modifiers on the rate of denaturation of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **240**, 1077-1082.

BLUMENTHAL, K.M. y SMITH, E.L. (1973) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **248**, 6002-6008.

BLUMENTHAL, K.M. y SMITH, E.L. (1975) NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **250**, 6560-6563.

BOGONEZ, E., SATRUSTEGUI, J. y MACHADO, A. (1985) Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase (NADP⁺) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1425-1432.

BONETE, M.J., CAMACHO, M.L. y CADENAS, E. (1986) Purification and some properties of NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium*. *Int. J. Biochem.* **18**, 785-789.

BONETE, M.J., CAMACHO, M.L. y CADENAS, E. (1987) A new glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium* with different coenzyme specificity. *Int. J. Biochem.* **19**, 1149-1155.

BONETE, M.J., CAMACHO, M.L. y CADENAS, E. (1989) Kinetic mechanism of *Halobacterium halobium* NAD-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 150-155.

BORGMANN, U., LAIDLER, K.J. y MOON, T.W. (1975) Kinetics and thermodynamics of lactate dehydrogenases from beef heart, beef muscle and flounder muscle. *Can. J. Biochem.* **53**, 1196-1206.

BOTTON, B. y MSATEF, Y. (1983) Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. *Physiol. Plant.* **59**, 438-444.

BRADBURY, S.L. y JAKOBY, W.B. (1971) Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **246**, 1834-1840.

BRISOU, J., COURTAIS, D. y DENIS, F. (1974) Microbiological study of a hypersaline lake in French Somaliland. *Appl. Microbiol.* **27**, 819-822.

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

BROWN, A.D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**, 803-846.

BURSELL, E. (1975) Glutamic dehydrogenase from sarcosomes of the tsetse fly (*Glossina morsitans*) and the blowfly (*Sarcophaga nodosa*). *Insect Biochem.* **5**, 289-297.

BURSTEIN, E.A., VEDENKINA, N.S. y IVKOVA, M.N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* **18**, 263-279.

BUZDYGON, B.E., BRAGINSKI, J.E. y CHUNG, A.E. (1973) Isocitrate dehydrogenase from *rhodospseudomonas spheroides*: Kinetic mechanism and further characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 400-408.

CADENAS, CH. (1985) Comportamiento cinético de la malato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*. Tesis Doctoral.

CAMACHO, M.L. (1984) Aislamiento y estudio cinético de glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium salinarium*. Tesis de Licenciatura.

CAMARDELLA, L., DI PRISCO, G., GAROFANO, F. y GUERRINI, A.M. (1976) Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from yeast nuclear fractions. *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 324-330.

CANO, C.D. (1987) Mecanismo cinético de la malato deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*. Tesis de Licenciatura.

CARVAJAL, N. y KESSI, E. (1988) Kinetic mechanism of octopine dehydrogenase from the muscle of the sea mollusc, *Concholepas concholepas*. *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 14-19.

CASSMAN, M. y SCHACHMAN, H.K. (1971) Sedimentation equilibrium studies on glutamic dehydrogenase. *Biochemistry* **10**, 1015-1024.

CAUGHEY, W.S., SMILEY, J.D. y HELLERMAN, L. (1957) L-glutamic acid dehydrogenase: structural requirements for substrate competition: effect of thyroxine. *J. Biol. Chem.* **224**, 591-607.

CAZZULO, J.J. (1972) Las bacterias halofílicas extremas. *Cienc. e Invest.* **28**, 207-213.

CAZZULO, J.J. (1973) On the regulatory properties of a halophilic citrate synthase. *FEBS Letters* **30**, 339-342.

CAZZULO, J.J. (1975) Las bacterias halófilas extremas. II. Enzimología y metabolismo. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* **7**, 68-80.

CAZZULO, J.J. y VIDAL, M.C. (1972) Effect of monovalent cations on the malic enzyme from the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *J. Bacteriol.* **109**, 437-439.

CENNAMO, C., MONTECUCCOLI, G. y BONARETTI, G. (1967) Anion and substrate inhibition and kinetic behavior of NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 232-243.

CHANG, T-Y. y JONES, M.E. (1974) Aspartate transcarbamylase from *S.faecalis*. Steady-state kinetic analysis. *Biochemistry* **13**, 638-645.

CHAPLIN, A.E., HUGGINS, A.K. y MUNDAY, K.A. (1965) Ionic effects on glutamate dehydrogenase activity from beel liver, lobster muscle and crab muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **16**, 49-62.

CHEN, S.S. y ENGEL, P. (1974) Protection of glutamate dehydrogenase by NAD against reversible inactivation by pyridoxal-5'-phosphate as a sensitive indicator of conformational change. *Biochem. J.* **143**, 569-574.

CHEN, S.S. y ENGEL, P. (1975) Ox liver glutamate dehydrogenase. The role of lysine-126 reappraised in the light of studies of inhibition and activation by pyridoxal-5'-phosphate. *Biochem. J.* **149**, 619-624.

CHRISTIAN, J.H.B. y **WALTHO, J.A.** (1962) Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 506-508.

CLELAND, W.W. (1963a) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104-137.

CLELAND, W.W. (1963b) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition : nomenclature and theory. *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 173-187.

CLELAND, W.W. (1963c) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 188-196.

CLELAND, W.W. (1967) Enzyme kinetics. *Ann. Rev. Biochem.* **36**, 77-112.

CLELAND, W.W. (1970) Steady state kinetics. En: *The Enzymes* (Ed. P.D.Boyer) Vol. II, pp.1-65. Academic Press Inc., New York.

CLELAND, W.W.(1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* **45**, 273-387.

CLELAND, W.W. (1979) Statistical analysis of enzyme kinetic data. En: *Methods in Enzymology* **63**, 103-138, Academic Press.

CLELAND, W.W. (1982) The use of pH studies to determine chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. En: *Methods in Enzymology* **87**, 390-405.

COLEN, A.H., PROUGH, R.A. y **FISHER, H.F.** (1972) The mechanism of glutamate dehydrogenase reaction. IV. Evidence for random and rapid binding of substrate and coenzyme in the burst phase. *J. Biol. Chem.* **247**, 7905-7909.

COLEN, A.H., WILKINSON, R.R. y FISHER, H.F. (1977) The transient-state kinetics of L-glutamate dehydrogenase. pH dependence of the burst rate parameters. *Biochim. Biophys. Acta* **481**, 377-383.

COOK, P.F. y CLELAND, W.W. (1981) pH variation of isotope effects in enzyme-catalyzed reactions. 1. Isotope- and pH-dependent steps the same. *Biochemistry* **20**, 1797-1805.

CORMAN, L. y INAMDAR, A. (1970) L-glutamate dehydrogenase (dogfish liver and chicken liver). En: *Methods in Enzymology* **17A**, 844-851.

CORMAN, L., PRESCOTT, L.M. y KAPLAN, N.O. (1967) Purification and kinetic characteristics of dogfish liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **242**, 1383-1390.

COULTON, J.W. y KAPOOR, M. (1973a) Purification and some properties of the glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 427-438.

COULTON, J.W. y KAPOOR, M. (1973b) Studies on the kinetics and regulation of glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 439-450.

COWGILL, R.W. (1967) Fluorescence and protein structure. X. Reappraisal of solvent and structural effects. *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 6-18.

CROSS, D.G. y FISHER, H.F. (1966) The spatial location of chromophoric residues in L-glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* **5**, 880-885.

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**, 2612-2621.

CROSS, D.G., MCGREGOR, L.L. y FISHER, H.F. (1972) The binding of α -ketoglutarate in a binary complex and in a ternary complex with NADP⁺ by L-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 28-36.

DALZIEL, K. (1969) The interpretation of kinetic data for enzyme-catalysed reactions involving three substrates. *Biochem. J.* **114**, 547-556.

DALZIEL, K. (1975) Kinetics and mechanism of nicotinamide-nucleotide-linked dehydrogenases. En: *The Enzymes* (Ed. P.D. Boyer) Vol. 11A, pp.2-60. Academic Press, New York.

DANIELS, L. y ZEIKUS, J.G. (1978) One carbon metabolism in methanogenic bacteria : analysis of short-term fixation products of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ incorporation into whole cells. *J. Bacteriol.* **136**, 75-84.

DANSON, M.J. (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv. Microbiol. Physiol.* **29**, 165-231.

DANSON, M.J., BLACK, S.C., WOODLAND, D.L. y WOOD, P.A. (1985) Citric acid cycle enzymes of the archaeobacteria: citrate synthase and succinate thiokinase. *FEBS Letters* **179**, 120-124.

DANSON, M.J., EISENTHAL, R., HALL, S., KESSELL, S.R. y WILLIAMS, D.L. (1984) Dihydrolipoamide dehydrogenase from halophilic archaeobacteria. *Biochem. J.* **218**, 811-818.

DEGANI, Y., VERONESE, F.M. y SMITH, E.L. (1974) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **249**, 7929-7935.

DE MÉDICIS, E., LALIBERTÉ, J-F. y VASS-MARENGO, J. (1982) Purification and properties of pyruvate kinase from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **708**, 57-67.

DEPERT, W., HUCHO, F. y SUND, H. (1973) Studies of glutamate dehydrogenase. Modification with 5-diazo-1H-tetrazole and glyoxal. Importance of two different amino groups for the binding of 2-oxoglutarate and NADH. *Eur. J. Biochem.* **32**, 76-82.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A. y GLIOZZI, A. (1986) Structure, biosynthesis and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* **50**, 70-80.

DESSEN, P. y PANTALONI, D. (1969) Glutamate déshydrogénase. Structure quaternaire et propriétés rotatoires. *Eur. J. Biochem.* **8**, 292-302.

DI FRANCO, A. e IWATSUBO, M. (1971) Complexes transitoires dans la catalyse de la glutamate déshydrogénase. *Biochimie* **53**, 153-159.

DI FRANCO, A. e IWATSUBO, M. (1972) Reaction mechanism of L-glutamate dehydrogenase. Characterization of optical and kinetic properties of various enzyme-reduced-coenzyme complexes. *Eur. J. Biochem.* **30**, 517-532.

DI PRISCO, G. y GAROFANO, F. (1974) Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from ox liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **58**, 683-689.

DIXON, M. y WEBB, E.C. (1979a) Effect of pH and temperature. En: *Enzymes*. pp.138-183. 3ª ed. Academic Press Inc., New York.

DIXON, M. y WEBB, E.C. (1979b) Enzyme Mechanism. En: *Enzymes*. pp.271-290. 3ª ed. Academic Press Inc., New York.

D'SOUZA, S.E. y ALTEKAR, W. (1983) Demonstration of some glycolytic activities in *Halobacterium halobium* and their significance. *Indian J. Biochem. Biophys.* **20**, 29-32.

DUCHARME, L., MATHESON, A.T. YAGUCHI, M. y VISENTIN, L.P. (1972) Utilization of amino acids by *Halobacterium cutirubrum*: in chemically defined medium. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1349-1351.

DUCHARS, M.G. y ATTWOOD, M.M.(1987) NADP-dependent glutamate dehydrogenase from the facultative methylotroph *Hyphomicrobium* X. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 133-137.

DUGGLEBY, R.G. y DENNIS, D.T. (1974) NAD-specific glyceraldehyde 3-phosphate from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. *J. Biol. Chem.* **249**, 167-174.

DUNDAS, I.E. (1972) Ornithine carbamoyltransferase from *Halobacterium salinarium*. *Eur. J. Biochem.* **27**, 376-380.

DUNDAS, I.E. (1977) Physiology of *Halobacteriaceae*. *Adv. Microbiol. Physiol.* **15**, 85-120.

DUNDAS, I.E. (1978) The normal *Halobacteriaceae*, the general physiology and taxonomy of a well adapted and highly successful group of microorganisms. En: *Energetics and structure of halophilic microorganisms* (Eds. S.R. Caplan y M. Ginzburg) pp.641-653. Elsevier North-Holland, Amsterdam.

EFTINK, M.R. y **GHIRON, C.A.**(1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* **15**, 672-680.

EGAN, R.R. y **DALZIEL, K.** (1971) Active centre equivalent weight of glutamate dehydrogenase from dry weight determinations and spectrophotometric titrations of abortive complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 47-50.

EISENBERG, H., HAIK, Y., IFFT, J.B., LEICHT, W., MEVARECH, M. y **PUNDAK, S.** (1978) Interactions of proteins and nucleic acids with solutes in concentrated solutions of monovalent salts, relating to hydration, structural transitions and inactivation of halophilic malate and glutamate dehydrogenases. En: *Energetics and structure of halophilic microorganisms*. (Eds. S.R.Caplan y M.Ginzburg) pp. 13-32, Elsevier North-Holland, Amsterdam.

EISENBERG, H., JOSEPHS, R. y **REISLER, E.**(1976) Bovine liver glutamate dehydrogenase. *Adv. Protein Chem.* **30**, 101-181.

EISENBERG, H., LEICHT, W., MEVARECH, M. y **WERBER, M.M.**(1977) Studies on dehydrogenases from *Halobacterium* of the Dead Sea. En: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases* (Ed. Sund, H.), pp.368-380. Walter de Gruyter y Co., Berlin, New York.

ENGEL, P.C. y **CHEN, S-S.** (1975) A product inhibition study of bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochem. J.* **151**, 305-318.

ENGEL, P.C. y **DALZIEL, K.** (1967) The equilibrium constants of glutamate dehydrogenase systems. *Biochem. J.* **105**, 691-695.

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

ENGEL, P.C. y DALZIEL, K. (1970) Kinetic studies of glutamate dehydrogenase. The reductive amination of 2-oxoglutarate. *Biochem. J.* **118**, 409-419.

EPSTEIN, I. y GROSSOWICZ, N. (1975) Purification and properties of glutamate dehydrogenase from a thermophilic bacillus. *J. Bacteriol.* **122**, 1257-1264.

FAHIEN, L.A. y STRMECKI, M. (1969a) Studies of gluconeogenic mitochondrial enzymes. II. The conversion of glutamate to α -ketoglutarate by bovine liver mitochondrial glutamate dehydrogenase and glutamate-oxaloacetate transaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 456-467.

FAHIEN, L.A. y STRMECKI, M. (1969b) Studies of gluconeogenic mitochondrial enzymes. III. The conversion of α -ketoglutarate to glutamate by bovine liver mitochondrial glutamate dehydrogenase and glutamate-oxaloacetate transaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 468-477.

FAHIEN, L.A., WIGGERT, B.O. y COHEN, P.P. (1965) Crystallization and kinetic properties of glutamate dehydrogenase from frog liver. *J. Biol. Chem.* **240**, 1083-1090.

FAWOLE, M.O. y CASSELTON, P.J. (1972) Observations on the regulation of glutamate dehydrogenase activity in *Coprinus lagopus*. *J. Exp. Bot.* **23**, 530-551.

FEWSON, CH. A. (1986) Archaeobacteria. *Biochem. Ed.* **14**, 103-115.

FISHER, H.F. (1960) The mechanism of the glutamic dehydrogenase reaction. I. The molecularity of the first complex formed. *J. Biol. Chem.* **235**, 1830-1834.

FISHER, H.F. (1973) Glutamate dehydrogenase - ligand complexes and their relationship to the mechanism of the reaction. *Adv. Enzymol.* **39**, 369-417.

FISHER, H.F. (1985) L-glutamate dehydrogenase from bovine liver. En: *Methods in Enzymology* **113**, 16-27. (Eds. S.P.Colowick y N.O.Kaplan). Academic Press.

FISHER, H.F. y **McGREGOR, L.L.** (1960) The nature of the fluorescence of an enzyme-reduced coenzyme-reduced substrate complex. *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 557-559.

FISHER, H.F., CROSS, D.G. y **McGREGOR, L.L.** (1962a). Catalytic activity of sub-units of glutamate dehydrogenase. *Nature* **196**, 895-896.

FISHER, H.F., McGREGOR, L.L. y **CROSS, D.G.** (1962b) The role of tyrosyl-hydrogen bonds in the quaternary structure of the glutamate dehydrogenase molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 175-177.

FISHER, H.F., PAZHANISAMY, S. y **MEDARY, R.T.** (1987) The anomalous properties of the glutamate dehydrogenase-NADPH- α -ketoglutarate complex are not ascribable to a carbonyl addition reaction. *J. Biol. Chem.* **262**, 11684-11687.

FITT, P.S. y **BADDOO, P.** (1979) Separation and purification of the alkaline phosphatase and a phosphodiesterase from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochem. J.* **181**, 347-353.

FITT, P.S. y **PETERKIN, P.I.** (1976) Isolation and properties of a small manganese-ion-stimulated bacterial alkaline phosphatase. *Biochem. J.* **157**, 161-167.

FORMOSO, C. y **FORSTER, L.S.** (1975) Tryptophan fluorescence lifetimes in lysozyme. *J. Biol. Chem.* **250**, 3738-3745.

FOX, G.E., MAGRUM, L.J., BALCH, W.E., WOLFE, R.S. y **WOESE, C.R.** (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 4537-4541.

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**, 457-463.

FREIDELFER, D.(1979) Espectroscopia de fluorescencia. En: Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. (Ed. Reverté, S.A.) pp.459-497. W.H. Freeman and Company.

FRIEDEN, C. (1959) Glutamic dehydrogenase. I. The effect of coenzyme on the sedimentation velocity and kinetic behavior. *J. Biol. Chem.* **234**, 809-814.

FRIEDEN, C. (1962) The effect of pH and other variables on the dissociation of beef liver glutamic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **237**, 2396-2400.

FRIEDEN, C.(1963a) Glutamate dehydrogenase. IV. Studies on enzyme inactivation and coenzyme binding. *J. Biol. Chem.* **238**, 146-154.

FRIEDEN, C.(1963b) Glutamate dehydrogenase.V. The relation of enzyme structure to the catalytic function. *J. Biol. Chem.* **238**, 3286-3298.

FRIEDEN, C. (1965) Glutamate dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. *J. Biol. Chem.* **240**, 2028-2035.

FRIEDEN, C. y **COLMAN, R.F.** (1967) Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant in the effect of purine nucleotides on enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **242**, 1705-1715.

FROMM, H.J. (1961) Evidence for ternary complex formation with rabbit muscle lactic acid dehydrogenase, diphosphopyridine nucleotide and pyruvic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 199-200.

FROMM, H.J. (1967) The use of competitive inhibitors in studying the mechanism of action of some enzyme systems utilizing three substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 221-230.

FROMM, H.J. (1975a) Product, Substrate and alternative substrate inhibitions. En: *Initial Rate Enzyme Kinetics*. pp.121-160. Springer-Verlag, Berlin.

FROMM, H.J. (1975b) Use of competitive substrate analogs and alternative substrates for studying kinetic mechanism. En: *Initial Rate Enzyme Kinetics*. pp.83-115. Springer-Verlag, Berlin.

FROMM, H.J.(1975c) Effect of pH on enzyme kinetics. En: *Initial Rate Enzyme Kinetics*. pp.201-224. Springer-Verlag, Berlin.

FROMM, H.J. (1975d) The effect of temperature on enzyme catalyzed reactions. En: *Initial Rate Enzyme Kinetics*. pp.224-235. Springer-Verlag, Berlin.

FROMM, H.J.(1979) Use of competitive inhibitors to study substrate binding order. En: *Methods in Enzymology* **63**, 467-486.

FROMM, H.J. y NELSON, D.R. (1962) Ribitol dehydrogenase III. Kinetic studies with product inhibition. *J. Biol. Chem.* **232**, 215-220.

FROMM, H.J. y ZEWE, V. (1962) Kinetic studies of the bovine hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* **237**, 1661-1667.

FUCHS, G. y STUPPERICH, E. (1978) Evidence for an incomplete reductive carboxylic acid cycle in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **118**, 121-125.

GEORGE, A. y BELL, J.E. (1980) Effects of adenosine 5'-diphosphate on bovine glutamate dehydrogenase: diethyl pyrocarbonate modification. *Biochemistry* **19**, 6057-6061.

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

GIBBONS, N.E.(1969) Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. En: *Methods in Microbiology* **3B**, 169-183.

GOLDIN, B.R. y FRIEDEN, C.(1971) L-glutamate dehydrogenase. *Curr. Top. Cell Reg.* **4**, 77-117.

GONZALEZ, P., VENTURA, E. y CALDES, T.(1976) Glutamate dehydrogenase from rat brain. En: *The Urea Cycle*. (Eds. S. Grisolia, R. Báguena y F. Mayor) pp.73-81, Wiley-Interscience Publication.

- GORE, M.G. (1981) L-glutamic acid dehydrogenase. *Int. J. Biochem.* **13**, 879-886.
- GORE, M.G. y GREENWOOD, C. (1972) Studies on the glutamate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **127**, 30P-31P.
- GORE, M.G. y GREENWOOD, C. (1975) Regulatory properties of reduced NADP on a GDH from *Neurospora crassa*. *Int. J. Biochem.* **6**, 829-833.
- GORE, M.G., RASCHED, I. y SUND, H. (1980) Conformationally important histidine residue in glutamate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *FEBS Letters* **122**, 41-44.
- GÖRISCH, H., HARTL, T., GROßBUTER, W. y STEZOWSKI, J.J. (1985) Archaeobacterial malate dehydrogenases. The enzymes from the thermoacidophilic organisms *Sulfolobus acidocaldarius* and *Thermoplasma acidophilum* show A-side stereospecificity for NAD⁺. *Biochem. J.* **226**, 885-888.
- GRIMSHAW, C.E. y CLELAND, W.W. (1981) Kinetic mechanism of *Bacillus subtilis* L-alanine dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 5650-5655.
- GRIMSHAW, C.E., COOK, P.F. y CLELAND, W.W. (1981) Use of isotope effects and pH studies to determine the chemical mechanism of *Bacillus subtilis* L-alanine dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 5655-5661.
- GRISOLIA, S., QUIJADA, C.L. y FERNANDEZ, M. (1964) Glutamate dehydrogenase from yeast and from animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 61-70.
- HAFNER, E.W. y WELLNER, D. (1971) Demonstration of imino acids as products of the reactions catalyzed by D- and L- amino acid oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 987-991.
- HAMES, B.D. (1981) An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Gel Electrophoresis of Proteins: a practical approach*. (Eds. B.D. Hames y D. Rickwood) pp.1-91, IRL Press Limited. London.

HAMMER, B.A. y JOHNSON, E.A.(1988) Purification, properties and metabolic roles of NAD⁺-glutamate dehydrogenase in *Clostridium botulinum* 113B. *Arch. Microbiol.* **150**, 460-464.

HARTMANN, R., SICKINGER, H-D., y OESTERHELT, D. (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **77**, 3821-3825.

HARTREE, E.(1972) Protein determination: an improved modification of Lowry's method which gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.

HEMMILA, I.A. y MANTSALA, P.I.(1978) Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **173**, 45-52.

HEMMINGS, B.A. (1978) Evidence for the degradation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase of *Candida utilis* during rapid enzyme inactivation. *J. Bacteriol.* **133**, 867-877.

HEMMINGS, B.A. (1980) Purification and some properties of the phospho and dephospho forms of yeast NAD-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **255**, 7925-7932.

HENDERSON, R.F., HENDERSON, T.R. y WOODFIN, B.M. (1970) Effects of D₂O on the association-dissociation equilibrium in subunit proteins. *J. Biol. Chem.* **245**, 3733-3737.

HERSH, R.T. (1962) Effect of sodium dodecyl sulfate on yeast alcohol dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 354-356.

HIGA, A. y CAZZULO, J.J.(1975) Some properties of the citrate synthase from the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *Biochem J.* **147**, 267-274.

HIGA, A., VIDAL, M.C. y CAZZULO, J.J. (1974) Activation and stabilization of halophilic enzymes by magnesium and calcium ions. *Experientia* **30**, 462-463.

HILDEBRAND, E. y SCHIMZ, A. (1983) Photosensory behavior of *Halobacterium halobium*. *Photochem. Photobiol.* **37**, 581-584.

HINMAN, L.M., COAN, C.R. y DERANLEAU, D.A.(1974) Solution topography of proteins by charge transfer. Model complexes, ribonuclease, and lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7067-7073.

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

HOCHREITER, M.C., PATEK, D.K. y SCHELLENBERG, K.A. (1972) Catalysis of α -iminoglutarate formation from α -ketoglutarate and ammonia by bovine glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **247**, 6271-6276.

HOCHSTEIN, L.I. y DALTON, B.P. (1968) Factors affecting the cation requirement of a halophilic NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 638-640.

HOCHSTEIN, L.I. y DALTON, B.P. (1973) Studies of a halophilic NADH dehydrogenase. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **302**, 216-228.

HOLLENBERG, C.P., RIKS, W.F. y BORST, P. (1970) The glutamate dehydrogenases of yeast: extra-mitochondrial enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 13-19.

HOLMES, P.K., DUNDAS, I.E.D. y HALVORSON, H.O.(1965) Halophilic enzymes in cell-free extracts of *Halobacterium salinarium*. *J. Bacteriol.* **90**, 1159-1160.

HOLMES, P.K. y HALVORSON, H.O.(1963) The inactivation and reactivation of salt-requiring enzymes from an extreme obligate halophile. *Can. J. Microbiol.* **9**, 904-906.

HOLMES, P.K. y HALVORSON, H.O.(1965) Properties of a purified halophilic malic dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **90**, 316-326.

HOOPER, A.B., HANSEN, J. y BELL, R.(1967) Characterization of glutamate dehydrogenase from the ammonia-oxidizing chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Biol. Chem.* **242**, 288-296.



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

HORNBY, D.P., ENGEL, P.C. y HATANKA, S.I. (1985) Kinetic studies of ox-liver glutamate dehydrogenase. Oxidative deamination of two glutamate analogues, L-threo- γ -methylglutamate and L- α -amino- γ -nitroamino-butyrates, in the presence of the allosteric effector ADP. *Int.J.Biochem.* **17**, 851-854.

HSU, R.Y., LARDY, H.A. y CLELAND, W.W. (1967) Pigeon liver malic enzyme. V. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **242**, 5315-5322.

HUANG, C.Y. y FRIEDEN, C. (1972) The mechanism of ligand-induced structural changes in glutamate dehydrogenase. Studies of the rate of depolymerization and isomerization effected by coenzymes and guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **247**, 3638-3646.

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

HUBBARD, J.S. y MILLER, A.B.(1972) Reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile: changes in the secondary structure. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 318-319.

HUCHO, F., MARKAU, U. y SUND, H. (1973) Studies of glutamate dehydrogenase. Characterization of histidine residues involved in the activity and association photoactivated labelling with pyridoxal 5'-phosphate. *Eur. J. Biochem.* **32**, 69-75.

IMHOFF, J.F. y RODRIGUEZ-VALERA, F. (1984) Betanine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* **160**, 478-479.

INOUE, T., FUKUSHIMA, K., TASTUMOTO, T. y SHIMOZOWA, R. (1984) Light-scattering study on subunit association-dissociation equilibria of bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **786**, 144-150.

IZOTOVA, L.S., STRONGIN, A.Y., CHEKULAEVA, L.N., STERKIN, V.E., OSTOSLAVSKAYA, V.I., LYUBLINSKYA, L.A., TINOKHINA, E.A. y STEPANOV, V.M. (1983) Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **155**, 826-830.

JALLON, J-M. y IWATSUBO, M. (1971) Evidence for two nicotinamide binding sites on L-glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 964-971.

JALLON, J-M. y IWATSUBO, M. (1973) Spectral properties of glutamate dehydrogenase complexes involving substrate analogues. *FEBS Letters* **33**, 97-100.

JANSON, C.A. y CLELAND, W.W. (1974) The kinetic mechanism of glycerokinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 2562-2566.

JANSSEN, D.B., OP DEN CAMP, H.J.M., LEENEN, P.J.M. y VAN DER DRIFT, C. (1980) The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **124**, 197-203.

JAVOR, B.J. (1984) Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salts requirements. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 352-360.

JIRGENSONS, B. (1961) Glutamic acid dehydrogenase. A protein of unusual conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3161-3162.

JOANNOU, C.L., BROWN, P.R. y TATA, R. (1988) Mutations affecting the synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-glutamate dehydrogenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 441-452.

JOHNSON, W.M. y WESTLAKE, D.W.S. (1972) Purification and characterization of glutamic acid dehydrogenase and α -ketoglutaric acid reductase from *Peptococcus aerogenes*. *Can. J. Microbiol.* **18**, 881-892.

JONES, W.S., NAGLE, D.P. y WHITMAN, W.B. (1987) Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* 51, 135-177.

JULLIARD, J.H. y SMITH, E.L. (1979) Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. *J. Biol. Chem.* 254, 3427-3438.

JURADO, M.N. (1985) Isocitrato deshidrogenasa NADP⁺-dependiente de *Halobacterium salinarium*: Aislamiento y estudios cinéticos. Tesis de Licenciatura.

KATES, M. y KUSHAWAHA, 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.461-480. Elsevier North-Holland, Amsterdam.

KATES, M., WASSEF, M.K. y PUGH, E.L. (1970) Origin of the glycerol moieties in the glycerol diether lipids of *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 202, 206-208.

KATO, K., KOIKE, S., YAMADA, K., YAMADA, H. y TANAKA, S. (1962) Di- and triphosphopyridine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of *Piricularia oryzae* and their behaviors in glutamate media. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 346-347.

KAUFMAN, B.T. y GARDINER, R.C. (1966) Studies on dihydrofolic reductase. I. Purification and properties of dihydrofolic reductase from chicken liver. *J. Biol. Chem.* 241, 1319-1328.

KERADJOPOULOS, D. y HOLLDORF, A.W. (1977) Thermophilic character of enzymes from extreme halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1, 179-182.

KERADJOPOULOS, D. y HOLLDORF, A.W. (1979) Purification and properties of alanine dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*. *Biochim. Biophys. Acta* 570, 1-10.

KERADJOPOULOS, D. y WULFF, K. (1974) Thermophilic alanine dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Biochem.* 52, 1033-1037.

KUICK, D.M., ALLEN, B.L., RAO, J.G.S., HARRIS, B.G. y COOK, P.F. (1984) Determination of dissociation constants for enzyme-reactant complexes for NAD-malic enzyme by modulation of the thiol inactivation rate. *Biochemistry* **23**, 5454-5459.

KIM, E.K. y FITT, P.S.(1977) Partial purification and properties of *Halobacterium cutirubrum* L-alanine dehydrogenase. *Biochem. J.* **161**, 313-320.

KIMURA, K., MIYAKAWA, A., IMAI, T. y SASAKAWA, T.(1977) Glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* PCI 219. I. Purification and properties. *J. Biochem.* **81**, 467-476.

KING, K.S. y FRIEDEN, C. (1970) The purification and physical properties of glutamate dehydrogenase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **245**, 4391-4396.

KING, J. y WU, W.Y.-F. (1971) Partial purification and kinetic properties of glutamic dehydrogenase from soybean cotyledons. *Phytochemistry* **10**, 915-928.

KLUNGSØYR, L. (1966) Purification of the mannitol-1-phosphate dehydrogenase of *E.coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 55-62.

KOSHLAND, D.E.Jr, NEMETHY, G. y FILMER, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **5**, 365-385.

KRAMER, J. (1970) NAD and NADP-dependent glutamate dehydrogenase in *Hydrogenomonas H16*. *Arch. Mikrobiol.* **71**, 226-234.

KUBO, H., IWATSUBO, H., WATARI, H. y SOYAMA, T. (1959) Sur la polymerisation et la forme moleculaire de la glutamico deshydrogenase. *J. Biochem.* **46**, 1171-1185.

KUMAR, S. y NICHOLAS, D.J.D. (1984) NAD⁺- and NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenases in *Nitrobacter agilis*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 967-973.

KUN, E. y ACHMATOWICZ, B. (1965) Studies with specific enzyme inhibitors. IX. Selective inhibitory effects of substrate analogues on the catalytic activity of crystalline glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **240**, 2619-2627.

KUNTZ, I.D. (1971) Hydration of macromolecules. III. Hydration of polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 514-516.

KUSHNER, D.J. (1968) Halophilic bacteria. *Advan. Appl. Microbiol.* **10**, 73-99.

KUSHNER, D.J. (1978) Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: *Microbial Life in Extreme Enviroments*. (Ed. D.J.Kushner) pp. 317-368. Academic Press, New York.

KUSHNER, D.J. (1985) The Halobacteriaceae. En: *The Bacteria. A Treatise on structure and function*. Vol. VIII. Archaeobacteria. (Eds. C.R.Woese y R.S.Wolfe) pp. 171-214. Academic Press, New York.

KUSHNER, D.J. (1986) Molecular adaptation of enzymes, metabolic systems and transport systems in halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 121-127.

KUSHNER, D.J. y KAMEKURA, M. (1988) Physiology of halophilic eubacteria. En: *Halophilic Bacteria*. (Ed.F.Rodriguez Valera) pp. 109-140. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.

LAIDLER, K.J. y PETERMAN, B.F. (1979) Temperature effects in enzyme kinetics. En: *Methods in Enzymology* **63**, 234-257.

LAKE, J.A., CLARK, M.W., HENDERSON, E., FAY, S.P., OAKES, M., SCHEINMAN, A., THORNER, J.P. y MAH, R.A. (1985) Eubacteria, halobacteria, and the origin of photosynthesis: The photocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3716-3720.

LAKE, J.A., HENDERSON, E., OAKES, M. y CLARK, M.W. (1984) Eocytes: A new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3786-3790.

LAKOWICZ, J.R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.

LANDON, M., MELAMED, M.D. y SMITH, E.L. (1971) Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. I. Isolation of tryptic peptides from the carboxymethylated protein. *J. Biol. Chem.* **246**, 2360-2373.

LANGWORTHY, T.A. (1985) Lipids of archaeobacteria. En: *The Bacteria. A Treatise on structure and function*. Vol. VIII. Archaeobacteria. (Eds. C.R.Woese y R.S.Wolfe) pp.459-497. Academic Press, New York.

LANYI, J.K. (1969) Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria. III. Mechanism of the effect of salt on menadione reductase. *J. Biol. Chem.* **244**, 4168-4173.

LANYI, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272-290.

LANYI, J.K. (1979) Physicochemical aspects of salt-dependence in Halobacteria. En: *Strategies of microbial life in extreme environments*. (Ed. M. Shilo) pp.93-107. Berlin: Dahlem Konferenzen.

LANYI, J.K. y SILVERMAN, M.P. (1972) The state of binding of intracellular K^+ in *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **18**, 993-995.

LANYI, J.K. y STEVENSON, J. (1969) Effects of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase. *J. Bacteriol.* **98**, 611-616.

LANYI, J.K. y STEVENSON, J. (1970) Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria. IV. Role of hydrophobic forces in the structure of menadione reductase. *J. Biol. Chem.* **245**, 4074-4080.

LARSEN, H. (1962) Halophilism. En: *The Bacteria*. Vol.4 (Eds. I.-C. Gunsalus y R.Y. Stanior) pp.297-342.

LARSEN, H. (1967) Biochemical aspects of extreme halophilism. *Advances in Microbial Physiology* **1**, 97-131.

LEE, H-J., CHEN, Y-H. y CHANG, G-G. (1988) Fluorescence studies on the dissociation and denaturation of pigeon liver malic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **955**, 119-127.

LEFFERS, H., KJEMS, J., OSTERGAARD, L., LARSEN, N. y GARRETT, R.A. (1987) Evolutionary relationships amongst archaeobacteria. A comparative study of 23S ribosomal RNAs of a sulphur-dependent extreme thermophile, an extreme halophile and a thermophilic methanogen. *J. Mol. Biol.* **195**, 43-51.

LEICHT, W., WERBER, M.M. y EISENBERG, H. (1978) Purification and characterization of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium* of the Dead Sea. *Biochemistry* **17**, 4004-4010.

LÉJOHN, H.B. (1967) AMP-activation of an allosteric NAD-dependent glutamate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 96-102.

LÉJOHN, H.B. (1968) Unidirectional inhibition of glutamate dehydrogenase by metabolites. A possible regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.* **243**, 5126-5131.

LÉJOHN, H.B. (1971) Enzyme regulation, lysine pathways and cell wall structures as indicators of major lines of evolution in fungi. *Nature* **231**, 164-168.

LÉJOHN, H.B. y JACKSON, S.G. (1968) Allosteric interactions of a regulatory nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase from *Blastocladia*. A molecular model for the enzyme. *J. Biol. Chem.* **243**, 3447-3457.

LÉJOHN, H.B., JACKSON, S.G., KLASSEN, G.R. y SAWULA, R.V. (1969) Regulation of mitochondrial glutamic dehydrogenase by divalent metals, nucleotides and α -ketoglutarate. *J. Biol. Chem.* **244**, 5346-5356

LÉJOHN, H.B. y MCCREA, B.E. (1968) Evidence for two species of glutamate dehydrogenases in *Thiobacillus novellus*. *J. Bacteriol.* **95**, 87-94.

LÉJOHN, H.B. y STEVENSON, R.M. (1970) Multiple regulatory processes in nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamic dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **245**, 3890-3900.

- LÉJOHN, H.B., SUZUKI, I. y WRIGHT, J.A. (1968) Glutamate dehydrogenases of *Thiobacillus novellus*. Kinetic properties and a possible control mechanism. *J. Biol. Chem.* **243**, 118-128.
- LEVIN, O. (1962) Column chromatography of proteins: Calcium phosphate. En: *Methods in Enzymology* **5**, 27-32.
- LIEBERMAN, 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**, 21-33.
- LIEBERMAN, M.M. y LANYI, J.K. (1972) Threonine deaminase from extremely halophilic bacteria. Cooperative substrate kinetics and salt dependence. *Biochemistry* **11**, 211-216.
- LIEBL, V., KAPLAN, J.G. y KUSHNER, D.J. (1969) Regulation of a salt-dependent enzyme: the aspartate transcarbamylase of an extreme halophile. *Can J. Biochem.* **47**, 1095-1097.
- LING, I.T., COOKSLEY, S., BATES, P.A., HEMPELMANN, E. y WILSON, R.J.M. (1986) Antibodies to the glutamate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **92**, 313-324.
- LOUIS, B.G., PETERKIN, P.I. y FITT, P.S. (1971) Nucleic acid enzymology of extremely halophilic bacteria. *Biochem. J.* **121**, 635-641.
- LÖBBEN, M., LÜNSDORF, H. y SCHAFER, G. (1987) The plasma membrane ATPase of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification and immunological relationships to F₁-ATPases. *Eur. J. Biochem.* **167**, 211-219.
- LUCENDO, M. (1986) Estudio cinético de la L-alanina deshidrogenasa de *Halobacterium halobium*. Tesis de Licenciatura.
- MALCOLM, A.D.B. y RADDA, G.K. (1970) The reaction of glutamate dehydrogenase with 4-iodoacetamido salicylic acid. *Eur. J. Biochem.* **15**, 555-561.

MALE, K.B. y STOREY, K.B. (1982) Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the cold-hardy gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *Insect. Biochem.* **12**, 507-514.

MALE, K.B. y STOREY, K.B. (1983) Kinetic characterization of NADP-specific glutamate dehydrogenase from the sea anemone. *Anthopleura xanthogrammica*: Control of amino acid biosynthesis during osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 823-829.

MARKAU, K., SCHNEIDER, J. y SUND, H. (1972) Kinetic studies on the mechanism of the action of ADP on the glutamate dehydrogenase reaction. *FEBS Letters* **24**, 32-36.

MARKAU, K. y STEINHÜBEL, I. (1972) Kinetic measurements with monocarboxylic acids as substrates and effectors of glutamate dehydrogenase. *FEBS Letters* **28**, 115-120.

MATVEEVA, N.I., NIKOLAEV, Y.A., VORONINA, N.A. y PLAKUNOV, V.K. (1987) Some principles of the energetics of amino acid transport in extremely halophilic bacteria. *Microbiology* **55**, 422-428.

MAULIK, P. y GHOSH, S. (1986) NADPH/NADH-dependent cold-labile glutamate dehydrogenase in *Azospirillum brasilense*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **155**, 595-602.

MAY, B.P. y DENNIS, P.P. (1987) Superoxide dismutase from the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Bacteriol.* **169**, 1417-1422.

MAZZINI, A. y FAVILLA, R. (1987) The effect of guanidinium chloride on the self-association of bovine liver glutamate dehydrogenase: A gel filtration study. *Z. Naturforsch* **42c**, 217-220.

MCDONALD, R.E., GREENE, R.V. y LANYI, J.K. (1977) Light-activated amino acid transport systems in *Halobacterium halobium* envelope vesicles: role of chemical and electrical gradients. *Biochemistry* **16**, 3227-3235.

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**, 11012-11019.

MEEK, T.D. y VILAFRANCA, J.J. (1980) Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry* **19**, 5513-5519.

MEVARECH, M., EISENBERG, H. y NEUMANN, E. (1977) Malate dehydrogenase isolated from extremely halophilic bacteria of the Dead Sea. 1. Purification and molecular characterization. *Biochemistry* **16**, 3781-3785.

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**, 2383-2387.

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**, 3786-3792.

MISONO, H., GOTO, N. y NAGASAKI, S. (1985) Purification crystallization and properties of NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 117-123.

MOFFET, F.J. y BRIDGER, W.A. (1970) The kinetics of succinyl coenzyme A synthetase from *E.coli*. A reaction with a covalent enzyme-substrate intermediate not exhibiting "ping-pong" kinetics. *J. Biol. Chem.* **245**, 2758-2762.

MOFFET, F.J. y BRIDGER, W.A. (1973) Succinyl coenzyme A synthetase of *E.coli* : initial rate kinetics of succinyl-CoA cleavage and isotope exchange studies. *Can. J. Biochem.* **51**, 44-55.

MONOD, J., CHANGEUX, J. y JACOB, M. (1965) On the nature of allosteric transition: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.

- MONTERO, C.G., VENTOSA, A., RODRIGUEZ-VALERA, F. y RUIZ-BERRAQUERO, F.** (1988) Taxonomic study of non-alkaliphilic Halococci. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 725-732.
- MOON, K., PISZKIEWICZ, D. y SMITH, E.L.** (1973) Amino acid sequence of chicken liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **248**, 3093-3103.
- MOON, K. y SMITH, E.L.** (1973) Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. VIII. Peptides produced by specific chemical cleavages; the complete sequence of the protein. *J. Biol. Chem.* **248**, 3082-3088.
- HAZARIO, M. y EVANS, J.A.** (1974) Physical and kinetic studies of arginyl transfer ribonucleic acid ligase of *Neurospora*. A sequential ordered mechanism. *J. Biol. Chem.* **249**, 4934-4942.
- NEET, K.E.** (1980) Cooperativity in enzyme function: Equilibrium and kinetic aspects. En: *Methods in Enzymology* **64**, 139-192, Academic Press.
- NIMMO, H.G.** (1986) Kinetic mechanism of *E.coli* isocitrate dehydrogenase and its inhibition by glyoxylate and oxaloacetate. *Biochem. J.* **234**, 317-323.
- NISSENBAUM, A.** (1975) The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microbiol. Ecol.* **2**, 139-161.
- NORBERG, P. y VAN HOFSTEN, B.** (1970) Chromatography of a halophilic enzyme on hydroxylapatite in 3.4 M sodium chloride. *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 132-133.
- 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**, 680-686.
- NORTHROP, D.B. y CLELAND, W.W.** (1974) The kinetics of pig heart triphosphopyridine nucleotide-isocitrate dehydrogenase. II. Dead-end and multiple inhibition studies. *J. Biol. Chem.* **249**, 2928-2931.

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**, 5168-5175.

OHSHIMA, T. y SAKURABA, H. (1986) Purification characterization of malate dehydrogenase from the phototrophic bacterium, *R. capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 171-177.

OLSON, J.A. y ANFINSEN, C.B. (1953) Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **202**, 841-856.

ONISHI, H., McCANCE, M.E. y GIBBONS, N.E. (1965) A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **11**, 365-373.

OREN, A. (1983) *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 381-386.

ORSI, B.A. y CLELAND, W.W. (1972) Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **11**, 102-109.

PANTALONI, D. y IWATSUBO, M. (1967) Fixation d'ADP, NADH et NADPH sur la glutamate déshydrogénase, déterminée par spectrophotométrie. *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 217-220.

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**, 5446-5453.

PEROZZO, M.A., WARD, K.B., THOMPSON, R.B. y WARD, W.W. (1988) X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals. *J. Biol. Chem.* **263**, 7713-7716.

PFLEIDERER, G., SANN, E. y ORTANDERL, F. (1963) The mechanism of action of dehydrogenases. The role of the adenosine diphosphate residue in nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 39-49.

PHIBBS, P.V. y BERNLOHR, R.W. (1971) Purification, properties and regulation of glutamic dehydrogenase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **106**, 375-385.

PISZKIEWICZ, D., LANDON, M. y SMITH, E.L. (1970) Bovine liver dehydrogenase. Sequence of a hexadecapeptide containing a lysyl residue reactive with pyridoxal 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* **245**, 2622-2626.

POPJAK, G. (1970) Stereospecificity of enzymic reactions. En: *The Enzymes*. Vol II. (Ed.P.D.Boyer) pp.115-157. Academic Press, New York.

POST, F.J. (1977) The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbiol. Ecol.* **3**, 143-165.

PROUGH, R.A., COLEN, A.H. y FISHER, H.F. (1972) Spectrophotometric observation of a glutamate dehydrogenase-L-glutamate complex. *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 16-19.

PUNDAK, S., ALONI, H. y EISENBERG, H. (1981) Structure and activity of malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacteria of the Dead Sea. 2. Inactivation, dissociation and unfolding at NaCl concentrations below 2M. Salt, salt concentration and temperature dependence of enzyme stability. *Eur. J. Biochem.* **118**, 471-477.

PUNDAK, S. y EISENBERG, H. (1981a) Structure and activity of malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacteria of the Dead Sea. 1. Conformation and interaction with water and salt between 5M and 1M NaCl concentration. *Eur. J. Biochem.* **118**, 463-470.

PUNDAK, S. y EISENBERG, H. (1981b) Enzymatic activity and stability of halophilic malate dehydrogenase in relation to hydration and interaction with salts. *studies biophysica* **84**, 29-30.

RAO, G.S.J., HARRIS, B.G. y COOK, P.F. (1987) Kinetic mechanism of *Ascaris suum* phosphofructokinase desensitized to allosteric modulation by diethylpyrocarbonate modification. *J. Biol. Chem.* **262**, 14074-14079.

RASCHED, I., JÖRNVALL, H. y SUND, H. (1974). Studies of glutamate dehydrogenase. Identification of an amino group involved in the substrate binding. *Eur. J. Biochem.* **41**, 603-606.

REISS, P.M., PIERCE, S.K. y BISHOP, S.H. (1977) Glutamate dehydrogenases from tissues of the ribbed mussel *Modiolus demissus*: ADP activation and possible physiological significance. *J. Exp. Zool.* **202**, 253-258.

REISTAD, R. (1970). On the composition and nature of the bulk protein of extremely halophilic bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **71**, 353-360.

RENARD, M. y DELMELLE, M. (1980) Quantum efficiency of light-driven proton extrusion in *Halobacterium halobium*. pH dependence. *Biophys. J.* **32**, 993-1006.

RICE, D.W., HORNBY, D.P. y ENGEL, P.C. (1985) Crystallization of an nicotinamide adenine dinucleotide-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. *J. Mol. Biol.* **181**, 147-149.

RIFE, J.E. y CLELAND, W.W. (1980a) Kinetic mechanism of glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* **19**, 2321-2328.

RIFE, J.E. y CLELAND, W.W. (1980b) Determination of the chemical mechanism of glutamate dehydrogenase from pH studies. *Biochemistry* **19**, 2328-2333.

ROBINSON, J. y KATZNELSON, H. (1953) Aspartate-glutamate transaminase in a red halophilic bacterium. *Nature* **172**, 672-673.

RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G. y KUSHNER, D.J. (1983) *Halobacterium mediterranei* sp. nov, a new carbohydrate utilizing extreme halophile. *System. Appl. Microbiol.* **4**, 369-381.

RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. (1980) Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* **26**, 1259-1263.

RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. (1981) Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbiol. Ecol.* **7**, 235-243.

RODRIGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A., JUEZ, G. y IMHOFF, J.F. (1985) Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbiol. Ecol.* **11**, 107-115.

ROGERS, K.S. (1972) Variable sulphhydryl activity toward silver nitrate by reduced glutathione and alcohol, glutamate and lactate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 309-314.

ROGERS, K.S., BOOTS, M.R. y BOOTS, S.G. (1972) Molecular interactions of six aromatic competitive inhibitors with bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 343-350.

ROON, R.J. y EVEN, H.L. (1973) Regulation of the NAD- and NADP- dependent glutamate dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **116**, 367-372.

ROSS, H.N.M. y GRANT, W.D. (1985) Nucleic acid. Studies on halophilic archaeobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 165-173.

RUDOLPH, F.B. (1979) Product inhibition and abortive complex formation. En: *Methods in Enzymology* **63**, 411-436.

RUDOLPH, F.B. y FROMM, H.J. (1969) Initial rate studies of adenylosuccinate synthetase with product and competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* **244**, 3832-3839.

RUDOLPH, F.B. y FROMM, H.J. (1979) Plotting methods for analyzing enzyme rate data. En: *Methods in Enzymology* **63**, 138-159.

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

SAKAMOTO, N., KOTRE, A.M. y SAVAGEAU, M.A. (1975) Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and properties. *J. Bacteriol.* **124**, 775-783.

SALLACH, H.J. y FAHIEN, L.A. (1969) Glutamate dehydrogenase. En: *Metabolic Pathways*. Vol.III. (Ed.D.M.Greenberg). pp.28-36. Academic Press, New York.

SANNER, T. (1971) Activation of glutamate dehydrogenase from *Blastocladiella emersonii* by AMP. *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 297-305.

SANWAL, B.D. (1961) Diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide linked glutamate dehydrogenases of *Fusarium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 377-386.

SANWAL, B.D. y LATA, M. (1961) The occurrence of two different glutamic dehydrogenases in *Neurospora*. *Can. J. Microbiol.* **7**, 319-328.

SANWAL, B.D. y LATA, M. (1962) Effect of glutamic acid on the formation of two glutamic acid dehydrogenases of *Neurospora*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 404-409.

SANZ, J.L., MARIN,I., BALBOA, M.A., UREÑA, D. y AMILS, R. (1988) An NH_4^+ -dependent protein synthesis cell-free system for Halobacteria. *Biochemistry* **27**, 8194-8199.

SCHAFFER, S., BARKOWSKI, C. y FUCHS, G. (1986) Carbon assimilation by the autotrophic thermophilic archaebacterium *Thermoproteus*. *Arch. Microbiol.* **146**, 301-308.

SCHIMERLICK, M.I. y CLELAND, W.W. (1977) Inhibition and alternate-substrate studies on the mechanism of malic enzyme. *Biochemistry* **16**, 565-571.

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

SEGEL, I.H. (1975) *Enzymes Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley, New York.

SHIIO, I. y OZAKI, H. (1970) Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J. Biochem.* **68**, 633-647.

SHIMIZU, H., KURATSU, T. y HIRATA, F. (1979) Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from *Proteus inconstans*. *J. Ferment. Technol.* **57**, 428-433.

SILVERSTEIN, E. y SULEBELE, G. (1969) Catalytic mechanism of pig heart mitochondrial malate dehydrogenase studied by kinetics at equilibrium. *Biochemistry* **8**, 2543-2550.

SILVERSTEIN, E. y SULEBELE, G. (1973) Equilibrium kinetic study of the catalytic mechanism of bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* **12**, 2164-2172.

SILVERSTEIN, E. y SULEBELE, G. (1974) Equilibrium kinetic study of the catalytic mechanism of oxidative deamination of alanine by bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* **13**, 1815-1818.

SMITH, E.L., AUSTEN, B.M., BLUMENTHAL, K.M. y NYC, J.F. (1975) Glutamate dehydrogenases. En: *The Enzymes* **11A** (Ed. P.D. Boyer) pp. 293-367. 3rd ed. Academic Press. New York.

SMITH, T.J. y BELL, J.E. (1982) Mechanism of hysteresis in bovine glutamate dehydrogenase: role of subunit interactions. *Biochemistry* **21**, 733-737.

SMITH, T.J. y BELL, J.E. (1985) Investigation of the effects of crosslinking glutamate dehydrogenase with dimethyl pimelimidate. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 63-73.

SMITH, E.L., LANDON, M., PISZKIEWICZ, D., BRATTIN, W.J., LANGLEY, T.J. y MELAMED, M.D. (1970) Bovine liver glutamate dehydrogenase: tentative amino acid sequence; identification of a reactive lysine; nitration of a specific tyrosine and loss of allosteric inhibition by guanosine triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**, 724-730.

SMITH, E.L. y PISZKIEWICZ, D. (1973) Bovine glutamate dehydrogenase. The pH dependence of native and nitrated enzyme in the presence of allosteric modifiers. *J. Biol. Chem.* **248**, 3089-3092.

SOO-HOO, T.S. y BROWN, A.D. (1967) A basis of the specific sodium requirement for morphological integrity of *Halobacterium halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 164-166.

SRINIVASAN, R. y FISHER, H.F. (1986) Structural features facilitating the glutamate dehydrogenase catalyzed α -imino acid- α -amino acid interconversion. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 743-750.

SRINIVASAN, R., VISWANATHAN, T.S. y FISHER, H.F. (1988) Mechanism of formation of bound α -iminoglutarate from α -ketoglutarate in the glutamate dehydrogenase reaction. A chemical basis for ammonia recognition. *J. Biol. Chem.* **263**, 2304-2308.

STETTER, K.O. y ZILLIG, W. (1985) *Thermoplasma* and the thermophilic sulfur-dependent archaebacteria. En: *The Bacteria*. Vol.8: *Archaebacteria*. (Eds.C.R.WOESE y R.S.WOLFE) pp.85-170. Academic Press, New York.

STOLL, V.S. y BLANCHARD, J.S. (1988) Kinetic mechanism and nucleotide specificity of NADH peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 752-762.

STOREY, K.B., FIELDS, J.H.A. y HOCHACHKA, P.W. (1978) Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. Role of the enzyme in energy production from amino acids. *J. Exp. Zool.* **205**, 11-118.

STRUCK, J. y SIZER, I.W. (1960) The substrate specificity of glutamic acid dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 260-266.

SUBOV, N.N. (1931) Oceanographical tables. U.S.S.R. Ocean. Inst. Hydrometeorol. Commun. Moscow.

SUND, H. (1963) Struktur und wirkungsweise der glutaminsäuredehydrogenase. I. Grösse und gestalt der glu-DH aus rinderleber. *Acta Chem. Scand.* **17**, S.102-S.106.

SUND, H. (1968) The pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. En: *Biological Oxidations*. (Ed.T.P.Singer) pp. 641-705. John Wiley, New York.

TABATABAI, L.B. y GRAVES, D.J. (1978) Kinetic mechanism and specificity of the phosphorylase kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **253**, 2196-2202.

TEALE, F.W.J. (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.* **76**, 381-388.

TEMPEST, D.W., MEERS, J.L. y BROWN, C.M. (1970) Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* **117**, 405-407.

TINDALL, B.J., ROSS, H.N.M. y GRANT, W.D. (1984) *Natrobacterium* gen.nov. and *Natronococcus* gen.nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **5**, 41-57.

TINDALL, B.J. y TRÜPER, H.G. (1986) Ecophysiology of the aerobic halophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 202-212.

TIPTON, K.F. y DIXON, B.F. (1979) Effects of pH on enzymes. En: *Methods in Enzymology* **63**, 183-234.

TOMKINS, G.M., YIELDING, K.L. y CURRAN, J.F. (1961) Steroid hormone activation of L-alanine oxidation catalyzed by a subunit of crystalline glutamic dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **47**, 270-278.

TOMKINS, G.M., YIELDING, K.L. y CURRAN, J.F. (1962) The influence of diethylstilbestrol and adenosine diphosphate on pyridine nucleotide coenzyme binding by glutamic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1704-1708.

TOMLINSON, G.A., KOCH, T.K. y HOCHSTEIN, L.I. (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can. J. Microbiol* **20**, 1085-1091.

TORREBLANCA, M., RODRIGUEZ-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. Microbiol.* **8**, 89-99.

TORSVIK, T. y DUNDAS, I. (1982) The classification of Halobacteria. En: *Methods in Enzymology* **88**, 360-368.

TYLER, B. (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 1127-1162.

UHR, M.L., THOMPSON, V.W. y CLELAND, W.W. (1974) The kinetics of pig heart triphosphopyridine nucleotide-isocitrate dehydrogenase. I. Initial velocity, substrate and product inhibition, and isotope exchange studies. *J. Biol. Chem.* **249**, 2920-2927.

UNO, I., MATSUMOTO, K., ADACHI, K. y ISHIKAWA, T. (1984) Regulation of NAD-dependent glutamate dehydrogenase by protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**, 1288-1293.

URBINA, J.A. y AZAVACHE, V. (1984) Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. II. NAD-dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **11**, 241-255.

VALLE, F., BECERRIL, B., OREN, E., SEEBURG, P., HEYNEKER, H. y BOLIVAR, F. (1984) Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from *E. coli* K-12. *Gene* **27**, 193-199.

VAN LAERE, A.J. (1988) Purification and properties of NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Phycomyces* spores. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1597-1601.

VERONESE, F.M., BOCCU, E. y CONVENTI, L. (1975) Glutamate dehydrogenase from *E. coli*: Induction purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 217-228.

VERONESE, F.M., NYC, J.F., DEGANI, Y., BROWN, D.M. y SMITH, E.L. (1974) NAD-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J.Biol.Chem.* **249**, 7922-7928.

VIOLA, R.E. y CLELAND, W.W. (1982) Initial velocity analysis for terreactant mechanisms. En: *Methods in Enzymology* **87**, 353-366.

VOM HIPPEL, P.H. y WONG, K-Y (1964) Neutral salts: The generality of their effects on the stability of macromolecular conformations. *Science* **145**, 577-580.

WADA,H., OSBORNE, J.C. y MANGANIELLO, V.C. (1987) Effects of temperature on allosteric and catalytic properties of the cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 5139-5144.

WAIS, A.C. (1986) Archaeobacteria: The road to the universal ancestor. *Bioessays* **5**, 75-78.

WEDLER, F.C. y BOYER, P.D. (1972) Substrate binding and reaction intermediates of glutamine synthetase (*E. coli* W) as studied by isotope exchanges. *J. Biol.Chem.* **247**, 984-992.

WEIMER, P.J. y ZEIKUS, J.G. (1979) Acetate assimilation pathway of *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **137**, 332-339.

WEINING, S. y NICHOLAS, D.J.D. (1987) Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Nitrobacter hamburgensis* strain X14. *Phytochemistry* **26**, 2151-2153.

WERBER, M.M. y MEVARECH, M. (1978) Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-Ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 447-456.

WERBER, M.M., MEVARECH, M., LEICHT, W. y EISENBERG, H. (1978) Structure-function relationships in proteins and enzymes of *Halobacterium* of the dead sea. En: *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*. pp. 427-445. (Eds. S.R. Caplan y M. Ginzburg) Elsevier, New York.

- WERBER, M.M., SUSSMAN, J.L. y EISENBERG, H.** (1986) Molecular basis for the special properties of proteins and enzymes from *Halobacterium marismortui*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 129-135.
- WICKEN, J.S., CHUNG, A.E. y FRANZEN, J.S.** (1972) Isocitrate dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. Order of substrate addition and product release. *Biochemistry* **11**, 4766-4778.
- WILKINSON, G.N.** (1961) Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**, 324-332.
- WINER, A.D., NOVOA, W.B. y SCHWERT, G.W.** (1957) Observations of new phenomena in the fluorescence spectrum of a diphosphopyridine nucleotide-linked dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6571-6572.
- WINER, A.D. y SCHWERT, G.W.** (1958) Fluorescence spectra of ternary complexes of dehydrogenases with reduced diphosphopyridine nucleotide and reduced substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 424-425.
- WINNACKER, E.L. y BARKER, H.A.** (1970) Purification and properties of a NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium SB₄*. *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 225-242.
- WOESE, C.R.** (1985) Why study evolutionary relationships among bacteria?. En: *Evolution of Prokaryotes* (Eds. E.Stackebrandt y K.O.Schleifer) pp. 1-30. Academic Press, London.
- WOESE, C.R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- WOESE, C.R. y FOX, G.E.** (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5088-5090.
- WOESE, C.R. y GUPTA, R.** (1981) Are archaebacteria merely derived 'prokaryotes'?. *Nature* **289**, 95-96.
- WOESE, C.R., GUPTA, R., HAHN, C.M., ZILLIG, W. y TU, J.** (1984) The phylogenetic relationships of three sulfur-dependent archaebacteria. *System. Appl. Microbiol.* **5**, 97-105

- WOESE, C.R. y OLSEN, G.J. (1986) Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 161-177.
- WOLFF, J. (1962) The effect of thyroxine on isolated dehydrogenases. II. Sedimentation changes in glutamic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **237**, 230-235.
- YAMAMOTO, I., ABE, A. y ISHIMOTO, M. (1987) Properties of glutamate dehydrogenase purified from *Bacteroides fragilis*. *J. Biochem.* **101**, 1391-1397.
- YARRISON, G., YOUNG, D.W. y CHOULES, G.L. (1972) Glutamate dehydrogenase from *Mycoplasma laidlawii*. *J. Bacteriol.* **110**, 494-503.
- YIELDING, K.L. y TOMKINS, G.M. (1961) An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Biochemistry* **47**, 983-989.
- YOU, K. (1982) Stereospecificities of the pyridine nucleotide-linked enzymes. En: *Methods in Enzymology* **87**, 101-126.
- ZEWE, V. y FROMM, H.J. (1965) Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. II. Mechanism of the reaction. *Biochemistry* **4**, 782-792.
- ZILLIG, W., YEATS, S., HOLZ, I., BÖCK, A., GROPP, F., RETTENBERGER, M. y LUTZ, S. (1985) Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature* **313**, 789-791.
- ZORATTI, M. y LANYI, J.K. (1987) Phosphate transport in *Halobacterium halobium* depends on cellular ATP levels. *J. Bacteriol.* **169**, 5755-5760.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

7. APENDICES.

I. LISTA DE ABREVIATURAS.

AEDT	Acido etilendiamino tetraacético
DEAE-celulosa	Diethylaminoetil-celulosa
DTNB	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
GDH	Glutamato deshidrogenasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
2-KG	2-oxoglutarato
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
PEP	Fosfoenolpiruvato
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenetilen diamina
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano

II. LISTA DE TABLAS.

<u>TABLA Nº</u>		<u>Página</u>
1	Distribución de glutamato deshidrogenasas según su especificidad de coenzima.....	35
2	Patrones de inhibición por producto para algunos mecanismos terreactantes.....	63
3	Patrones de inhibición competitiva para algunos mecanismos terreactantes.....	67
4	Tipos de mecanismos propuestos para distintas GDHs.....	74
5	Reactivos y disoluciones para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y 12.5% en presencia de SDS.....	91
6	Purificación de NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	108
7	Purificación de NADP-GDH de <i>H. halobium</i>	113
8	Valores de pHs óptimos para GDHs de diversas fuentes.....	118
9	Valores de K_m para los sustratos de NAD-GDHs de diversas fuentes.....	127
10	Valores de K_m para los sustratos de NAD-GDHs de diversas fuentes.....	128
11	Pesos moleculares de GDHs de diversas fuentes.....	134
12	Efecto de intermediarios metabólicos en NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	137

TABLA NºPágina

13	Efecto de aminoácidos en NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	141
14	Valores de $t_{1/2}$ y de K_1 para la inactivación de NAD- y NADP-GDH de <i>H. halobium</i> al disminuir la concentración salina.....	158
15	Valores de las longitudes de onda de emisión máximas e intensidades de fluorescencia para ambas enzimas en estado activo e inactivo...	168
16	Constantes cinéticas y de inhibición aparentes para NAD-GDH de <i>H. halobium</i> . Reacción de desaminación.....	176
17	Constantes cinéticas y de inhibición aparentes para NAD-GDH de <i>H. halobium</i> . Reacción de aminación.....	181
18	Constantes de inhibición para la aminación catalizada por NAD-GDH de <i>H. halobium</i> con glutarato e hidroxilamina como inhibidores..	186
19	Valores de K_m y $V_{máx}$ para los tres sustratos de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> a diferentes pHs. Reacción de aminación.....	198
20	Variación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ con el pH en la aminación reductiva de NADP-GDH de <i>H. halobium</i> para los tres sustratos.....	203
21	Valores de pK para los tres sustratos de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> en la aminación.	207

TABLA N^oPágina

22	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la temperatura para los tres sustratos de NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	212
23	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de NaCl para los tres sustratos de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> en la aminación.....	216
24A	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de KCl para el 2-oxoglutarato de NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	217
24B	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de KCl para el amonio de NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	218
24C	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de KCl para el NADH de NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	219
25	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de NaCl para los tres sustratos de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> en la desaminación.....	224
26	Variación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con la concentración de KCl para los tres sustratos de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> en la aminación.....	225

III. LISTA DE FIGURAS.

<u>FIGURA Nº</u>	<u>Página</u>
1	Arbol filogenético de los tres reinos en los que se agrupan los organismos..... 5
2	Fotografía de las salinas de la provincia de Alicante donde se localizan estas halo- bacterias..... 10
3	Esquema del mecanismo químico de GDH..... 53
4	Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano y tirosina excitando a 295 nm.... 94
5	Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano y tirosina excitando a 275 nm.... 95
6	Espectro de emisión de fluorescencia de una disolución conteniendo triptófano y tirosina, excitando a 295 nm y 275 nm..... 97
7	Cromatografía hidrofóbica en Sepharosa-4B con gradiente continuo decreciente de sulfato amónico.....105
8	Purificación de la actividad NADP-GDH de <i>H. halobium</i> mediante cromatografía de tamizado molecular en Sepharosa-4B.....109
9	Purificación de la actividad NADP-GDH de <i>H. halobium</i> mediante cromatografía de tami- zado molecular en Sephadex G-100.....111

FIGURA NºPágina

10	Purificación de la actividad NADP-GDH de <i>H. halobium</i> mediante cromatografía en hidroxapatito con gradiente discontinuo creciente de tampón fosfato sódico.....	112
11	Efecto del pH en las dos enzimas de <i>H. halobium</i>	116
12	Dependencia de la temperatura para ambas enzimas de <i>H. halobium</i>	121
13	Efecto del NaCl y KCl sobre la actividad de las dos enzimas de <i>H. halobium</i>	124
14	Estimación del peso molecular aparente de las dos enzimas de <i>H. halobium</i>	132
15	Activación de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> por L-aminoácidos en la aminación reductiva.....	142
16	Activación de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> por L-aminoácidos en la desaminación oxidativa..	143
17	Estabilidad de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> frente al pH.....	146
18	Inactivación térmica de las dos GDHs de <i>H. halobium</i>	148
19	Inactivación de NAD-GDH de <i>H. halobium</i> a bajas concentraciones de NaCl.....	151
20	Inactivación de NADP-GDH de <i>H. halobium</i> a bajas concentraciones de NaCl.....	152
21	Influencia del NaCl en la velocidad de inactivación de ambas enzimas.....	154

FIGURA NºPágina

22	Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> en forma activa excitando a 295 nm.....	162
23	Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> en forma activa excitando a 275 nm.....	164
24	Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> en forma inactiva excitando a 295 nm.....	165
25	Espectro de emisión de fluorescencia de ambas enzimas de <i>H. halobium</i> en forma inactiva excitando a 275 nm.....	166
26	Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de NAD^+ a varias fijadas de glutamato.....	172
27	Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glutamato a varias fijadas de NAD^+	173
28	Inhibición por 2-oxoglutarato en la desaminación oxidativa.....	177
29	Inhibición por amonio frente a los dos sustratos de la desaminación oxidativa, y por NADH frente a glutamato.....	178
30	Inhibición por NADH en la desaminación frente a NAD^+	179
31	Inhibición por NAD^+ y por glutamato frente al sustrato NADH.....	182

FIGURA NºPágina

32	Inhibición por NAD^+ y por glutamato frente al sustrato amonio.....	183
33	Inhibición por NAD^+ y por glutamato frente al sustrato 2-oxoglutarato.....	184
34	Inhibición por glutarato frente a los tres sustratos de la aminación reductiva.....	187
35	Inhibición por hidroxilamina frente a los tres sustratos de la aminación reductiva....	188
36	Inhibición por 2-oxoglutarato en la desaminación oxidativa frente a cada uno de los sustratos manteniendo el sustrato fijo correspondiente a una concentración saturante.....	191
37	Representación del $\log V_{\text{máx}}$ frente al pH para cada uno de los sustratos de la aminación reductiva catalizada por NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	199
38	Representación del $\log V_{\text{máx}}/K_m$ frente al pH para cada uno de los sustratos de la aminación reductiva catalizada por NAD-GDH de <i>H. halobium</i>	201
39	Representación del $\log V_{\text{máx}}$ frente al pH para cada uno de los sustratos de la aminación reductiva catalizada por NADP-GDH de <i>H. halobium</i>	204
40	Representación del $\log V_{\text{máx}}/K_m$ frente al pH para cada uno de los sustratos de la aminación reductiva catalizada por NADP-GDH de <i>H. halobium</i>	205

FIGURA Nº

Página

41	Representación de Arrhenius para los tres sustratos de la reacción de aminación catalizada por NAD-GDH de <i>H. halobium</i>211
42	Representación de Scatchard para NADH en la aminación catalizada por NAD-GDH de <i>H. halobium</i> a tres concentraciones de KCl.....221
43	Representación de Scatchard para NADH en la aminación catalizada por NAD-GDH a KCl 0.25M.....222