

00381

105.2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

LAS ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS DEL
TELEOSTEO Fundulus heteroclitus (LINNAEUS).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

(BIOLOGIA MARINA)

PRESENTA LA M. EN C.

LUCIA IRENE GONZALEZ VILLASEÑOR

MEXICO, D.F., M E X I C O

1982

00381

1982.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

PAGINA

CAPITULO I	1
INTRODUCCION GENERAL	2
1. <u>FUNDULUS HETEROCLITUS</u> : EL ORGANISMO "MODELO"	3
2. EL PAPEL DE LAS ISOZIMAS	13
3. DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICA: EL SISTEMA PROTEICO MODELO	19
4. METAS DE LA TESIS	31

CAPITULO II

ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS DE <u>Fundulus heteroclitus</u> (L.): DISTRIBUCION EN TEJIDOS, PURIFICACION AND CARACTERIZACION	33
A. INTRODUCCION	34
B. MATERIALES Y METODOS	36
1. Reactivos Químicos	36
2. Especímenes	36
3. Cristalería	37
4. Sistemas Buffer	37
5. Nomenclatura de las isozimas	38
6. Distribución en tejidos	39
a. Preparación del tejido	39
b. Electroforesis en gel de almidón	40

c. Metodos de teñido: Actividad de NADP-IDH	41
Actividad de NAD-IDH	41
d. Ensayo enzimático para NAD-IDH	41
7. Tratamiento de columnas de: intercambio iónico, afinidad y filtración en gel	42
8. Determinacion de proteína	43
9. Ensayo enzimático	43
10. Precipitación con sulfato de amonio	43
11. Purificación de las isozimas	44
A. Isozimas del hígado	44
a) Aislamiento mitocondrial	44
b) Separación y purificación	46
B. Isozima muscular	49
12. Determinación de peso molecular	49
13. Isoelectroenfoque	52
14. Diálisis, concentración y almacenaje de muestras .	53
15. Estudios de estabilidad térmica	54
C. RESULTADOS	56
1. Distribución en tejidos	56
2. Detección de IDH-específica para NAD	60
3. Precipitación con sulfato de amonio	60
4. Purificación de las isozimas del hígado y músculo .	60
5. Criterios de pureza	69

6. Determinaciones de peso molecular	74
7. Isoelectroenfoque	80
8. Estudios de estabilidad térmica	82
a) Inactivación térmica	82
b) Cinética de la inactivación térmica	91
D. DISCUSION	95
1. Distribución en tejidos	95
2. Deshidrogenasa isocítrica NAD-específica	96
3. Purificación de las isozimas de hígado y músculo ..	99
a) Problemas de purificación	99
b) Recuperación de la isozima mitocondrial.	101
c) Cromatografía de afinidad	102
4. Isoelectroenfoque	105
5. Estudios de estabilidad térmica	107

CAPITULO III

ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS

DE <u>Fundulus heteroclitus</u> (L.): CINETICA ENZIMATICA	114
A. INTRODUCCION	115
B. MATERIALES Y METODOS	115
1. Reactivos químicos	115
2. Cristalería	116
3. Datos bioquímicos	116

4. Sistemas buffer	117
5. Estandarización de sustrato y coenzima	117
6. Correcciones de pK y fuerza iónica (u)	120
7. Estabilización de proteína	120
8. Determinación de proteína	122
C. PROCEDIMIENTOS CINETICOS	122
D. ESTUDIOS DE pH Y TEMPERATURA	124
1. Estudios de cinética a temperatura constante (25°C) y pH 7.4	124
2. Estudios de cinética a temperatura constante (25°C) y pH variable	125
3. Estudios de cinética a pH constante (ph 8.0) y temperatura variable	126
E. PROCESAMIENTO DE DATOS	127
1. Estimación de velocidades iniciales	127
2. Estimación de constantes cinéticas	127
3. Análisis estadístico de las constantes cinéticas .	129
4. Estimación de los parámetros termodinámicos	129
F. FORMULACIONES TEORICAS	130
G. RESULTADOS	138
1. Inactivación de la deshidrogenasa isocítrica después de diluir	138
2. Linearidad de los ensayos enzimáticos	138

3. Velocidad inicial a alta molaridad de sustratos ..	140
4. Estudios de velocidad inicial a 25°C y pH 7.4 para las isozimas IDH-A ₂ , IDH-B ₂ , and IDH-C ₂	146
5. pH: estudios de velocidad inicial en función de pH a 25°C para las isozimas IDH-B ₂ and IDH-C ₂	151
6. Temperatura: estudios de velocidad inicial en función de temperatura a pH 8.0 para las isozimas IDH-B ₂ y IDH-C ₂	158
H. DISCUSSION	172
1. Estudios de pH	172
2. Estudios de temperatura	173
3. Papel fisiológico de las isozimas NADP-IDH de <u>Fundulus heteroclitus</u>	178
a) Papel de las isozimas IDH en músculo blanco..	178
b) Papel de las isozimas IDH en hígado.....	181
APENDICE I	189
A. ECUACION PARA LA CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA	190
B. DERIVACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS	203
APENDICE II	208
A. APLICACION PRACTICA DE LAS ISOZIMAS	209
B. ESTUDIOS FUTUROS	215
BIBLIOGRAFIA	217

LISTA DE TABLAS

PAGINA

TABLA 2.1	Distribución de las isozimas IDH en los tejidos de <u>Fundulus heteroclitus</u>	57
TABLA 2.2	Actividades "relativas" de la deshidrogenasa isocítrica NAD específica de los tejidos de <u>Fundulus heteroclitus</u>	61
TABLA 2.3	Precipitación fraccionada con sulfato de amonio de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica del hígado (IDH-B ₂)	63
TABLA 2.4	Resumen de la purificación de las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de <u>Fundulus heteroclitus</u>	65
TABLA 2.5	Resumen de algunas propiedades de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de varias fuentes	81
TABLA 2.6	Puntos isoelectricos de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de varias fuentes animales	86
TABLA 3.1	Datos bioquímicos usados para el cálculo de la fuerza iónica de los buffers y la estandarización de sustratos	118
TABLA 3.2	Correcciones para mantener fuerza iónica constante en los buffers para estudios de pH y temperatura	121
TABLA 3.3	Resumen de los parámetros cinéticos para las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de <u>F. heteroclitus</u> a pH 7.4 y 25°C	150
TABLA 3.4	Algunos parámetros cinéticos para la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de diferentes fuentes animales	152
TABLA 3.5	Estimación de las constantes cinéticas para IDH-B ₂ y IDH-C ₂ en función del pH a 25°C	153

TABLA 3.6	Estimación de las constantes cinéticas para IDH-B ₂ y IDH-C ₂ en función de la temperatura a pH 8.0	160
TABLA 3.7	Parámetros de activación termodinámicos para la máxima descarboxilación oxidativa de isocitrato ($V_{\text{max}}^{\text{f}}$) para las isozimas IDH-B ₂ y IDH-C ₂ a pH 8.0	165
TABLA A.1	Ajuste de los datos de desnaturalización térmica por computación	191

LISTA DE FIGURAS

		PAGINA
FIGURA 1.1	Mecanismo para la oxidación de isocitrato catalizada por la deshidrogenasa isocítrica NADP específica	21
FIGURA 2.1	Carta esquemática describiendo los principales pasos de purificación de las isozimas IDH del hígado y músculo.....	50
FIGURA 2.2a	Especificidad en tejidos de los loci Idh en <u>Fundulus heteroclitus</u>	58
FIGURA 2.2b	Análisis representativo de homogeneizados de hígado mostrando los fenotipos comunes para los loci Idh-A y Idh-B de catorce individuos	59
FIGURA 2.3	Salado de la isozima deshidrogenasa isocítrica NADP específica del musculo con sulfato de amonio	62
FIGURA 2.4	Perfil de la columna de Affi-gel azul mostrando la elución de la enzima IDH con un pulso de NADP	66
FIGURA 2.5	Cromatografía de intercambio catiónico de las isozimas IDH-A ₂ y IDH-B ₂ en celulosa CM-52	67
FIGURA 2.6	Perfil de elución representativo para la enzima deshidrogenasa isocítrica NADP específica en gel de Sephadex G-150	68
FIGURA 2.7	Cromatografía de intercambio aniónico para la isozima IDH-C ₂ sobre gel de Sephacel DEAE	70
FIGURA 2.8	Trazos densitométricos y fotografías de tres geles en SDS-poliacrilamida mostrando los picos y bandas de las isozimas IDH purificadas de <u>F. heteroclitus</u>	72
FIGURA 2.9	Trazos densitométricos y fotografías de cuatro geles de poliactilamida en condiciones de no-desnaturalización para las isozimas IDH	73

FIGURA 2.10	Determinación del peso molecular nativo de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica sobre Sephadex G-200	75
FIGURA 2.11	Determinación del peso molecular de la subunidades de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica en geles de SDS-poliacrilamida al 10%	77
FIGURA 2.12	Trazos densitométricos y fotografías de dos geles de poliactilamida-SDS mostrando algunos estándares internos incluidos con la isozima pura IDH-B ₂ para la determinación de la masa de las subunidades	78
FIGURA 2.13A	Perfil de elución de un extracto de las isozimas IDH del hígado en una columna de isoelectroenfoque LKB de 110 ml	83
FIGURA 2.13b	Perfil de elución de la enzima IDH del músculo en una columna de isoelectroenfoque LKB de 110 ml	84
FIGURA 2.14	Registros densitométricos y fotografías de dos geles de poliactilamida al 10% conteniendo a las isozimas IDH del hígado separadas por isoelectroenfoque	85
FIGURA 2.15	Perfiles de inactivación por calor de las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de <u>F. heteroclitus</u>	87
FIGURA 2.16	Perfiles de inactivación por calor de las isozimas IDH de <u>F. heteroclitus</u> en presencia de sustrato (isocitrato)	88
FIGURA 2.17	Perfiles de inactivación por calor de la isozima muscular (IDH-C ₂) en presencia de manganeso, NADP e isocitrato	89
FIGURA 2.18	Cinética de la desnaturalización térmica de las isozimas IDH de <u>F. heteroclitus</u>	92
FIGURA 2.19	Cinética de la desnaturalización térmica de la isozima muscular (IDH-C ₂) a diferentes temperaturas de incubación	93

FIGURA 2.20	Cinética de la desnaturalización térmica de la isozima muscular (IDH-C ₂) en presencia de isocitrato y NADP	94
FIGURA 3.1	Curso del tiempo durante la inactivación de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica despues de dilución	139
FIGURA 3.2a	Trazos de Eadie-Hofstee para la isozima IDH-B ₂ ilustrando los diferentes niveles de enzima en la cual el ensayo es lineal ..	141
FIGURA 3.2b	Efecto de la velocidad maxima (Vmax) sobre los valores de Km para isocitrato ...	142
FIGURA 3.3	Estudios de velocidad inicial a altos niveles de Mn ²⁺ , isocitrato y NADP para las isozimas IDH-C ₂ y IDH-B ₂	144
FIGURA 3.4	Gráficas primaria y secundarias características de complejo ternario para los datos cinéticos de la isozima IDH-B ₂	147
FIGURA 3.5	Variación de la Km para isocitrato y NADP y Vmax en función de pH a 25°C	154
FIGURA 3.6	Variación de Vmax/Km para isocitrato y NADP en función de temperatura a pH 8.0 ...	157
FIGURA 3.7	Variación de Km para isocitrato y NADP en función de temperatura a pH 8.0	161
FIGURA 3.8	Variación de Vmax /Km para isocitrato y NADP en función de temperatura a pH 8.0 ...	162
FIGURA 3.9	Gráficas de Arrhenius para la tasa máxima de descarboxilación oxidativa de isocitrato (Vmax) para IDH-B ₂ y IDH-C ₂	164
FIGURA 3.10	Gráficas Hanes-Woolf para IDH-B ₂ y IDH-C ₂ a diferentes temperaturas de ensayo	167
FIGURA 3.11	Via isocitrato-malato ilustrando el papel metabólico de las isozimas NADP-IDH	183

FIGURA 3.12 Esquema de una posible vía de oxidación de isocitrato catalizado por las isozimas citoplásmica y mitocondriales del hígado de Fundulus heteroclitus 185

FIGURA A.1-A.9 Cinética de la desnaturalización térmica de las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus 192

RESUMEN

Las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de Fundulus heteroclitus (L.) fueron examinadas. Las tres isozimas exhiben diferencias en localización subcelular y distribución en tejidos. Las formas del hígado son polimórficas, una localizada en la mitocondria (IDH-A₂) y la otra en el citoplasma (IDH-B₂). La tercera isozima (IDH-C₂) es monomórfica y esta localizada en la mitocondria del músculo blanco. Estas isozimas fueron purificadas y caracterizadas. Los masas moleculares nativa y de las subunidades indican que ellas son dímeros de 90,000 daltones, con una masa molecular de la subunidad de $45,000 \pm 3,000$ daltones. Los puntos isoeléctricos (pI) fueron 5.19 y 7.0 para las isozimas del hígado y 5.29 para la forma muscular. Los estudios de desnaturalización térmica mostraron que existen diferencias en estabilidad termica entre las isozimas en el siguiente orden: IDH-B₂ > IDH-A > IDH-C₂. La cinética de la desnaturalización térmica no fue de primer orden. Todas las isozimas incrementaron su estabilidad térmica en presencia de sustratos. Este efecto fue diferente para cada una de ellas. Los estudios de cinética enzimática mostraron que las isozimas IDH siguen un mecanismo complejo ternario secuencial como ocurre en otras deshidrogenasas NADP específicas. Estudios a pH(7.4) y temperatura (25°C) constantes

mostraron que no hay diferencias en la K_m de isocitrato para las isozimas del hígado (IDH-A₂ y IDH-B₂). IDH-C₂ exhibió una mayor K_m para isocitrato. La K_m de NADP para IDH-B₂ fue menor que las de IDH-A₂ y IDH-C₂. La V_{max} exhibió marcadas diferencias entre las tres isozimas. Mientras los estudios a seis diferentes pH (25°C) revelaron que V_{max} y K_m para isocitrato son independientes de pH, la K_m para NADP es dependiente de pH. El efecto de temperatura sobre los parámetros cinéticos también fue estudiado a pH 8.0 y fuerza iónica constante sobre un rango de temperaturas de 10° a 35°C en incrementos de cinco grados. Estos estudios mostraron que la V_{max} y K_m para isocitrato y coenzima son dependientes de temperatura. Los valores de energía de activación (E_a) para IDH-B₂ y IDH-C₂ fueron 11 y 14 Kcal/mol, respectivamente, y los coeficientes de temperatura Q_{10} fueron 1.79 y 2.3, respectivamente. Ambas isozimas mostraron un valor de ΔG^\ddagger de 15 Kcal/mol. Estos estudios sugieren que la isozima citoplásmica del hígado (IDH-B₂) tiene una tasa de catálisis mayor que la isozima del músculo (IDH-C₂). Los datos cinéticos fueron usados para describir el posible papel metabólico de las diferentes isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus.



CAPITULO I
INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

Los animales en diferentes hábitats se enfrentan a una variedad de factores ambientales tales como: temperatura, oxígeno, salinidad, pH, etc., a los cuales deben adaptarse. Esta adaptación puede ser expresada a diferentes niveles biológicos incluyendo: los conductuales, morfológicos, fisiológicos, genéticos, del desarrollo, etc.

Dos diferentes estrategias de adaptación pueden ser empleadas. Los animales que se ajustan internamente con respecto al medio ambiente externo, se denominan conformadores. Aquellos que mantienen su medio ambiente interno constante con respecto al externo se denominan reguladores. Aunque estas dos estrategias de adaptación son diferentes, ambas permiten el mantenimiento de homeostasis. Por ejemplo, cuando la temperatura externa cambia, la temperatura interna de los conformadores (i.e., poikilótermos) también cambia, pero la temperatura de los reguladores (i.e., homeótermos) no cambia.

La adaptación puede ocurrir en diferentes períodos de tiempo: (i) respuestas directas se logran por medio de un incremento o decremento inmediato de las tasa metabólica; (ii) respuestas compensatorias generalmente toman de días a semanas para la aclimatación; y (iii) adaptaciones evolutivas se logran solamente en períodos muy largos de tiempo (varias generaciones)(Wohlschlag, 1964; Somero, 1969; Proser, 1975).

Los mecanismos empleados en estos tipos de adaptación han sido revisados por Prosser (1967,1973,1975).

Mi tesis trata sobre el efecto de temperatura y pH en la deshidrogenasa isocítrica NADP específica del pez poikilotérmico, Fundulus heteroclitus. Este capítulo introductorio es dedicado a (1) el animal modelo Fundulus heteroclitus y su medio ambiente; (2) una revisión del papel de las isozimas; (3) una revisión del papel metabólico de la NAD-IDH y NADP-IDH; y (4) las metas específicas de la tesis.

1. FUNDULUS HETEROCLITUS: EL ORGANISMO MODELO.

Phylum: Pisces

Clase: Osteichthyes - Peces Oseos

Orden: Atheriniformes (Cyprinodontiformes: Microcyprini)

Familia: Cyprinodontidae

Género: Fundulus

Especie: heteroclitus (Linnaeus)

Nombre común: Mummichog (A.F.S., 1980)

Los adultos son generalmente de 5 a 10 cm de longitud, con algunos individuos hasta de 12 a 15 cm. El color es verdoso oscuro de arriba y amarillento de abajo. Los machos presentan numerosos puntos blancos o amarillos en los lados. Las aletas son medianas y oscuras; la aleta dorsal puede tener una mancha negra en el último rayo. Las hembras tienen aletas medianas con rayas verticales oscuras en la

aleta caudal, aunque éstas, a menudo, no se presentan (Eddy, 1957). Ambos sexos muestran cambios adaptativos en la intensidad del color dependiendo del trasfondo (Newman, 1970). La familia Cyprinodontidae contiene 48 especies. De éstas, 24 son del genero Fundulus, 15 de las 24 son especies de agua dulce. Las nueve restantes aparecen en ambas agua salada y dulce o en agua salobre. Ocho especies se encuentran a lo largo de la Costa del Atlántico y una especie a lo largo de la Costa del Pacífico (A.F.S., 1980).

Desde el punto de vista morfológico, el género es muy diverso, y varían en talla, proporciones del cuerpo, conducta, hábitat y fisiología. Por estas razones las relaciones entre las especies del género son conflictivas y han sido frecuentemente divididas dentro de varios generos.

Estudios morfológicos (Farris, 1968) y hematológicos (Griffith, 1972) proveen un panorama completo del género y sirven como base sólida en estudios evolutivos. Las clasificaciones basadas en cariotipos (Chen, 1971) muestran que Fundulus heteroclitus tiene un cariotipo derivado que lo mantiene en una posición importante en la filogenia. Griffith (1972) concluye que el Fundulus ancestral fue una especie eurihalina de agua salobre, y que la subsecuente evolución del género incluyó el aislamiento de las poblaciones en agua dulce. Basados en la similitud de las formas y las características, el "stock basal" de Fundulus está representado

actualmente por F. heteroclitus en la Costa del Atlántico, F. grandis en la Costa del Golfo, y F. parvipinis en la Costa del Pacífico, lo cual se cree es importante para la especiación y evolución del género. Otros estudios incluyendo aquellos basados en zoogeografía (Relyea, 1967), hibridización (Setzer, 1970), parásitos (Dillon, 1965), conducta (Foster, 1967), bioquímica (Flemming et al, 1962), evidencia fósil (Yyeno y Miller, 1962), análisis de proteínas de suero (Griffith, 1972), y análisis genético de especies representativas (Powers, no publicado), proveen evidencia de la estrategia evolutiva del género Fundulus.

Miller (1955) da un rango para F. heteroclitus de Labrador al Noreste de Florida. Eddy (1957) describe al pez como una especie de agua salobre, que entra a agua dulce desde Maine hasta Texas, en EU. Leim y Scott (1966) dan el rango desde Newfoundland, Canada hasta el Río Matanzas en Florida.

F. heteroclitus es típicamente encontrado en estuarios de marea, bahías y esteros. En ciertas áreas geográficas locales los peces se mantienen en un rango estrecho en los sistemas pantanosos aislados durante el verano (Lotrich, 1975). Los peces también permanecen en los mismos pantanos durante los meses de invierno, siendo activos y moviéndose contra la corriente en áreas pantanosas de mas baja salinidad media (Fritz et al, 1975). Bigelow y Schroeder

(1953) han sugerido que la mayoría de los mummichogs en el Golfo de Maine pueden ser encontrados entre 80 metros de la costa. Este rango de persistencia de F. heteroclitus en una área, indica la conducta relativamente no-migratoria de la especie, lo cual puede ser muy importante para estudios bioquímico-genéticos (Powers y Place, 1978), y para correlaciones con temperatura ambiental. F. heteroclitus es encontrado en uno de los gradientes térmicos más agudos del mundo, con grandes variaciones estacionales en la temperatura de cada localidad (Powers y Powers, 1975; Powers y Place, 1978).

F. heteroclitus es común en ambas agua dulce y de mar (De Sylva et al., 1962) y es posible que su tolerancia a altas salinidades refleje la habilidad de la especie para ajustarse a cambios de salinidad. La salinidad favorita de Fundulus heteroclitus es aproximadamente 17.43 p.p.t. (mesohalina), sin embargo, ellos pueden tolerar agua dulce (menor de 1 p.p.t.) sin presentar problemas o mostrar mortalidad apreciable (Griffith, 1972). Pickford (1953) y Burden (1956) demostraron que hipofisectomía previene la sobrevivencia de F. heteroclitus en agua dulce, el cual normalmente tolera este medio con facilidad. Además bajo hipofisectomía F. heteroclitus mostró una marcada caída de los niveles de electrolitos en suero (Griffith, 1972).

Joseph y Saskena (1966) no notaron mortalidad de F. heteroclitus abajo de salinidades de 100 p.p.t. y observaron sobrevivencia hasta 134 p.p.t. (salmuera), pero bajos niveles de calcio en medios hipertónicos influyen la habilidad osmoregulatoria del pez. De acuerdo a Foster (1967), el animal no muestra preferencia cuando se le coloca en gradientes verticales de salinidad, y se adapta tan eficientemente a cambios de concentración, que el consumo de oxígeno es igual para individuos aclimatados en agua dulce y en agua salada (Garside y Kee, 1972). Estudios fisiológicos en pez han mostrado que el consumo de oxígeno, de peces en descanso, es independiente del oxígeno presente disuelto en el agua, hasta valores de por lo menos 50% de saturación con aire (Hart, 1969). De acuerdo a Griffith (1972), el consumo de oxígeno en F. heteroclitus es independiente de los niveles de oxígeno del ambiente aun a niveles muy bajos.

La tolerancia térmica de F. heteroclitus es igualmente alta. Umminger (1969) fue capaz de mantener mummichogs vivos a -1.5°C por períodos mayores de dos meses. Garside y Kee (1972) han registrado temperaturas medias letales tan altas como 36°C .

Fundulus heteroclitus es un animal ovíparo y polígamo (Newman, 1907). Los huevos son colocados naturalmente en racimos de 10-300 escondidos en la parte interna de las hojas de Spartina alterniflora (Taylor et al, 1977) o en conchas

vacías del mejillón del Atlántico Geukensia demissa (Able y Castagna, 1975). En las poblaciones naturales de Fundulus heteroclitus, el desove ocurre cíclicamente a través de la estación reproductiva. La madurez gonadal y desove de machos y hembras es máxima durante los días que coinciden con luna nueva o luna llena. El ritmo de desove es un componente importante de la secuencia reproductiva que parece ser de significado adaptativo en el medio ambiente de los pantanos de marea. El tiempo de desarrollo de los huevos dura de 8 a 9 días y la eclosión ocurre durante la fase ascendente del ciclo de marea semilunar (Taylor et al, 1979). El ciclo de desove de F. heteroclitus es acompañado por cambios cíclicos de hidratación del ovario, la talla del huevo y el desarrollo folicular (Taylor y DiMichele, 1980). La corionasa (enzima de eclosión) que digiere el corión que rodea al embrión de F. heteroclitus produce fragmentos peptídicos solubles en agua, y requiere de cationes divalentes para su actividad (DiMichele et al, 1981). La incubación de huevos en agua ajustada a rangos de salinidad, pH y temperatura dentro del rango fisiológico de la especie, no tiene efecto directo sobre la eclosión; sin embargo, agua y concentraciones bajas de oxígeno disuelto son necesarios para que ocurra eclosión (DiMichele y Taylor, 1980). Estudios sobre el mecanismo de eclosión en F. heteroclitus han revelado que la talla de las células y la actividad de la corionasa es maximizada en el

décimo día y de ahí en adelante permanece constante hasta hasta la eclosión (DiMichele y Taylor, 1981). F. heteroclitus tiene una estación de crianza relativamente corta, la cual se extiende desde Junio a través de la primera mitad de Julio en Woods Hole, Massachussets, y de finales de Mayo a finales de Agosto en Beaufort, North Carolina (Brummett, 1966).

Boyd y Simmonds (1974) describieron un sistema de criadero para la producción natural de huevos de Fundulus heteroclitus a través del año. Además, también producen huevecillos sin fibrilla coriónica, permitiendo la observación directa del embrión en desarrollo sin manipulación del huevo. F. heteroclitus fue una de las especies de peces seleccionadas para experimentar junto con material lunar durante el programa Apollo Lunar Quarantine (Simmonds et al, 1972; Simmonds, 1970).

Estudios sobre la dinámica de producción de poblaciones de F. heteroclitus en esteros de marea, han mostrado que ellos hacen una contribución importante en la transferencia de energía a pantanos de marea (Meredith y Lotrich, 1979). Peces jóvenes del año contribuyen por lo menos con el 78% de la producción anual. Lotrich (1978) afirma que la conducta estacionaria de F. heteroclitus puede ser benéfica energéticamente durante la captura de la presa y puede ser una explicación parcial de su alta productividad.

Debido a su amplia distribución geográfica, es probable que esta especie tenga una función importante en el flujo de energía en otros pantanos de marea del Este de los E.U. (Meredith y Lotrich, 1979). Valiela et al (1977) reporta que 1.5% de la producción total en F. heteroclitus es usada en productos gonadales. Esta especie es uno de los peces residentes más abundantes y un componente importante en la descripción del flujo de energía en los pantanos de marea de la costa del Atlántico. Las estimaciones de producción para las poblaciones naturales de Fundulus son entre las más altas por unidad de área registradas por pez (Valiela et al, 1977; Meredith y Lotrich, 1979).

De Sylva et al (1962) y Schmelz (1964) reportan que el contenido estomacal de F. heteroclitus consiste principalmente de larvas de insectos bentónicos, invertebrados, detritus y algas. La alta productividad de F. heteroclitus junto con su baja dependencia por detritus de plantas y materiales de plantas vivas para su nutrición, sugiere que éste es un importante carnívoro en los pantanos de marea (Meredith y Lotrich, 1979). Es también un importante predador de invertebrados (Kneib, 1980), y es considerado como especie forrajera importante para otros peces (Bigelow y Schroeder, 1953). En comparación con otras especies de peces, F. heteroclitus tiene una eficiencia de asimilación mas alta que el promedio y una eficiencia de crecimiento total menor que

el promedio. Los costos metabólicos responden en promedio por el 69% de la energía ingerida. Las tasas de excreción son también altas (Weisberg y Lotrich, 1982).

La fluctuación ambiental es característica del hábitat de F. heteroclitus. La temperatura del agua en zonas de marea varía estacionalmente y durante el día, según la dirección del flujo de marea y la localidad. La temperatura varía de 1°C en enero a 22°C en septiembre, con diferencias de temperatura de 4° a 10°C entre la pleamar y baja mar (Valiela et al, 1977). En los pantanos salobres (Nixon y Oviatt, 1973) la temperatura estacional varía de -0.5°C a 30°C; el rango de temperatura anual varía de 0°C a 34°C, con un promedio de 25°C (Erkenbrecher y Stevenson, 1977). Se han encontrado correlaciones significativas entre la temperatura media del agua y la latitud. Debido a la amplia distribución de F. heteroclitus, éste es encontrado en un gradiente termico muy agudo. Por lo tanto, las fluctuaciones de salinidad y temperatura afectan su hábitat, y la temperatura es probablemente un factor importante a considerar debido a su marcado efecto en los procesos metabólicos.

Estudios de genética bioquímica en Fundulus heteroclitus han mostrado que diferentes sistemas enzimáticos son altamente polimórficos (Whitt, 1969; 1970b, Place y Powers, 1978, etc.). La existencia de diferentes genotipos en el pez puede ser ventajoso, ya que se pueden lograr reajustes

compensatorios debido a variaciones de temperatura. Cuando se examinaron algunos genotipos a través de toda su distribución geográfica, la frecuencia de la variación de los genes con la latitud se encontró altamente correlacionada con la temperatura ambiental (Powers y Powers, 1975; Powers y Place, 1978; Cashon et al, 1981). Muchos estudios bioquímicos detallados en diferentes sistemas enzimáticos en Fundulus heteroclitus han sido llevados a cabo (Powers y Powers, 1975; Place y Powers, 1978, 1979; Cashon, 1981) para elucidar las propiedades funcionales y estructurales de diferentes genotipos. También se han mostrado correlaciones entre el tiempo de eclosión del embrión de F. heteroclitus, y su resistencia al nado, con el genotipo LDH-B (DiMichele y Powers, 1982b y a).

En resumen, la amplia distribución y abundancia de este pez a lo largo de la costa del Atlántico y a través de la Bahía de Chesapeake, lo hace un excelente "modelo" biológico en muchos campos de investigación, por ejemplo, biología molecular, bioquímica, toxicología, biología del desarrollo, fisiología, embriología, parasitología, histología, endocrinología, sistemática y evolución. Las poblaciones son relativamente continuas desde Canadá hasta Florida, y especies cercanamente relacionadas se extienden hasta Texas y México. La vasta literatura disponible (Huver, 1973) en muchos aspectos de la biología de Fundulus heteroclitus pro-

porciona excelentes bases para el desarrollo de nuevos enfoques en investigación y teorías evolutivas.

2. EL PAPEL DE LAS ISOZIMAS:

En la mayoría de los tejidos animales, muchos sistemas enzimáticos han sido resueltos dentro de formas moleculares múltiples, y una gran variación proteica ha sido observada (Prakash et al, 1969). Estas formas múltiples son llamadas isozimas (Markert, 1975). Las isozimas codificadas por diferentes loci genéticos son denominadas isozimas multi-locus y son obtenidas de genes duplicados evolutivamente. Estas pueden exhibir diferente distribución en los tejidos y localización celular. Las variantes genéticas de una isozima, codificadas por un solo locus genético, son denominadas isozimas alélicas o alozimas.

La temperatura es un factor del medio ambiente importante capaz de inducir cambios en la estructura, función y actividad de las enzimas (Hochachka y Somero, 1973). Las isozimas pueden ser inducidas por tensión ambiental y ser benéficas al organismo en que ocurren (Redding y Schreck, 1979). Algunas isozimas tienen propiedades funcionales ventajosas únicas (Powers, 1972; Powers y Powers, 1975; Place y Powers, 1979; Tanis et al, 1973; Carter et al, 1973).

En los peces teleosteos, las formas enzimáticas múltiples pueden asegurar que, bajo ciertas condiciones de

presión y temperatura, una forma activa de la enzima esté presente (Somero, 1975a). Por ejemplo, la deshidrogenasa isocítrica (Moon y Hochachka, 1971a y b; Baldwin y Hochachka, 1970) y estearasa de acetilcolina de la trucha tienen isozimas térmicamente inducidas. En los salmones, se cree que el alto grado de heterogeneidad enzimática es debido a la síntesis de isozimas únicas. Tal heterogeneidad incrementa la flexibilidad y adaptabilidad molecular de las especies al enfrentarse a medios ambientes térmicamente fluctuantes (Moon, 1975).

Alteraciones cualitativas de los patrones isoziomáticos pueden también ocurrir como resultado de aclimatación a temperatura (Wilson et al, 1975). Así, los efectos de temperatura sobre enzimas homólogas pueden ayudar a entender los mecanismos de adaptación enzimática y su significado evolutivo (Somero, 1969b; Hochachka y Somero, 1973).

Los mecanismos de adaptación de las isozimas a la temperatura han sido también investigados por medio del estudio de propiedades cinéticas, físicas y termodinámicas. De los datos de la deshidrogenasa láctica LDH-M₄ del pez dorado Wilson, (1977a) ha sugerido que la selección de la magnitud de los parámetros termodinámicos de activación puede haber sido importante en la evolución de LDH. Diferencias en la magnitud de los parámetros de activación, que condujeron a diferencias marcadas en las eficiencias catalíticas de en-

zimas homólogas, puede ser debido en parte a un incremento en la formación de enlaces débiles durante la generación de complejos activados enzima-sustrato. Muchas reacciones catalizadas por las enzimas de poikiloterms tienen parámetros termodinámicos de activación más bajos que las de las reacciones homólogas en homeoterms (Low y Somero, 1974).

Cambios de temperatura producen modificaciones en la afinidad enzima-sustrato de la enzima deshidrogenasa láctica. Una reducción de temperatura da como resultado una disminución en los valores de K_m (Burgos et al, 1973). Correlaciones entre las temperaturas del ensayo y la K_m sugieren que se pueden lograr en parte compensaciones de corto plazo de las tasas metabólicas durante fluctuaciones de temperatura, a través de variaciones en la K_m (Somero, 1975b; Hochachka y Somero, 1973). Tales correlaciones han sido también estudiadas en deshidrogenasa láctica de músculo (Merritt, 1972; Wilson, 1977a; Yancey y Somero, 1978). Así, las especies poikilotérmicas están, generalmente, enzimáticamente adaptadas para sus medios ambientes térmicos (Somero, 1969b).

Otro parámetro físico importante a considerar es el pH. El pH de los fluidos extracelular e intracelular de los poikiloterms cambia con la temperatura del cuerpo de -0.015 a -0.020 pH unidades por $^{\circ}C$, i.e., el pH varía inversamente con la temperatura del cuerpo (Rahn et al, 1975; Wilson,

1977a). Estudios en diferentes sistemas de enzimas han mostrado cambios en el pH óptimo (Hoskins y Aleksink, 1973; Rosenmann et al, 1977).

En adición a los efectos de temperatura y pH sobre la estructura y función de las isozimas, estudios sobre la estructura molecular de éstas a través de la de secuencia de amino ácidos y análisis cristalográficos proveen detalles de las relaciones genéticas y evolutivas, y el probable origen y función de las isozimas en la regulación de vías metabólicas (Horecker, 1975). El efecto de iones, metabolitos, cofactores e interacciones de subunidades en las isozimas, suministra información sobre la expresión actual de éstas en la forma de moléculas proteicas funcionales (Shaklee, 1975; Braswell, 1975; Ainsle y Cleland, 1982).

Las isozimas constituyen una fuente abundante para estudios de poblaciones y evolución. Los loci de enzimas polimórficas han sido ampliamente usados para medir la frecuencia de alelos en poblaciones (Powers y Place, 1978; Cashon et al, 1981). Los patrones espaciales de la frecuencia de genes de muchos diferentes loci permiten una estimación de posibles presiones de selección cuando se acoplan con otros estudios. Una gran cantidad de variación genética detectada electroforéticamente entre poblaciones naturales ha sido estimada en Drosophila (Lewontin y Hubby, 1966), en la anguila (Taniguchi y Numachi, 1978), en la merluza (Smith et

al, 1979), en el salmón del Atlántico (Cross y Payne, 1977), y en Fundulus heteroclitus (Whitt, 1970b; Mitton y Kohen, 1975; Place y Powers, 1978; Cashon et al, 1981).

Las formas por las cuales las isozimas pueden ser generadas han sido estudiadas en una amplia variedad de organismos. Evidencia de duplicación de genes en la deshidrogenasa isocítrica NADP específica ha sido mostrada en la trucha arcoiris (Allendorf y Utter, 1973), en el pez dorado y la carpa (Quiroz-Gutierrez y Ohno, 1970), y en el frijol de soya (Yong et al, 1981). Formas múltiples de enzimas pueden también surgir por medios químicos o físicos no-genéticos (Markert y Whitt, 1968), a través de alteraciones secundarias en la estructura de especies de polipéptidos aisladas. Las isozimas también son útiles para determinar el origen de ciertos alelos en poblaciones naturales (Minezawa et al, 1980), o la evolución de sistemas de enzimas (Whitt et al, 1975; Yoshida, 1975). La extensa variación proteica en una gran variedad de poblaciones naturales ha sido también el foco de discusión entre las dos escuelas de pensamiento evolutivo: la seleccionista y la neutralista (revisadas por Lewontin, 1974). Los neutralistas mantienen que las variantes proteicas son adaptativamente equivalentes o selectivamente neutras (Kimura, 1968; 1979), y los seleccionistas sostienen que los polimorfismos observados entre las poblaciones son formas no-equivalentes mantenidas por selección natural.

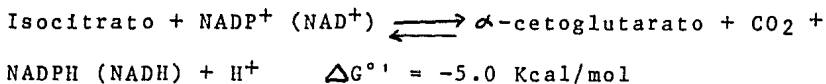
Una gran cantidad de evidencia experimental apoya el punto de vista de que los polimorfismos entre loci enzimáticos son no-equivalentes (Johnson, 1974; Wills, 1975; Scandalios et al, 1972; Place y Powers, 1979, etc.). En Fundulus, las isozimas alélicas de la deshidrogenasa láctica tienen sutiles diferencias estructurales y catalíticas (Place y Powers, 1979; Place, 1979), que se reflejan al nivel de todo el organismo (DiMichele y Powers, 1982a y b). Las alozimas de otros sistemas enzimáticos en Fundulus como la deshidrogenasa malato MDH-A (Cashon, 1981) y la isomerasa glucosa fosfato GPI-B (Van Beneden, no publicado) han también mostrado tener diferencias significativas en algunas de sus propiedades físicas y cinéticas. Estos datos son consistentes con, pero no prueban, el punto de vista seleccionista. Hasta la fecha, ambas escuelas de pensamiento neutralista y seleccionista están teóricamente apoyadas por una gran cantidad de trabajo experimental y matemático; sin embargo, esta controversia permanece aun sin solución.

La abundante literatura disponible sobre el uso de las isozimas en estudios de estructura molecular, biología del desarrollo, función fisiológica, y genética y evolución (Markert, 1975) constituyen la mejor prueba de su importante papel en el entendimiento y la solución de preguntas fundamentales en muchos campos de la biología.

En resumen, los organismos generalmente sintetizan la mayoría de sus enzimas en varias formas moleculares distintas denominadas isozimas. Su localización en un tejido específico, o estructura celular, puede llenar requerimientos metabólicos especializados. El conocimiento de su estructura y propiedades cinéticas provee la clave para el entendimiento de su papel en la fisiología de las células, así como su origen genético y evolutivo. Las evidencias sugieren que la variación proteica tiene significado adaptativo. Sin embargo, el significado de tal variación proteica es un asunto en controversia aún no resuelto y constituye el foco central de muchos estudios evolutivos recientes.

3. DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICA: EL SISTEMA PROTEICO MODELO.

La enzima Deshidrogenasa Isocitrica NADP⁺: es-pecífica [threo-Ds-Isocitrato: Oxidoreductasa NADP⁺ (Descarboxiladora) E.C. 1.1.1.42] cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato y requiere de iones metales divalentes como Mn²⁺ o Mg²⁺ para ser activada. Un segundo tipo de deshidrogenasa isocítrica requiere de NAD⁺ como aceptor de electrones. La reacción general catalizada por los dos tipos de enzima es idéntica:



Ambas deshidrogenasas isocítricas ligadas a NADP y NAD ocurren en la mitocondria de la mayoría de los organismos pero la segunda es encontrada exclusivamente en la mitocondria, mientras que la primera está presente en ambas mitocondria y citoplasma. La enzima ligada a NAD es una enzima alostérica que requiere ADP como un modulador de actividad específico. La enzima ligada a NADP no ha sido clasificada como alosterica. La mayoría de la evidencia disponible indica que la deshidrogenasa isocítrica NAD específica es el catalizador principal para la oxidación de isocitrato en el ciclo del ácido tricarbóxico; es decir, sirve principalmente en respiración, transfiriendo electrones de sustratos hacia oxígeno.

La deshidrogenasa isocítrica NADP específica se cree que sirve principalmente en la transferencia de electrones de los intermediarios del catabolismo a los intermediarios de biosíntesis, pero puede bajo ciertas circunstancias participar en la oxidación de isocitrato en la mitocondria (Lehninger, 1975).

Los mecanismos de descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato han sido mostrados por Colman (1975) en corazón de puerco. Ambas enzimas NAD y NADP específicas mostraron mecanismos similares en la descarboxilación oxidativa de isocitrato. La Figura I.1 muestra el mecanismo postulado para la descarboxilación de isocitrato

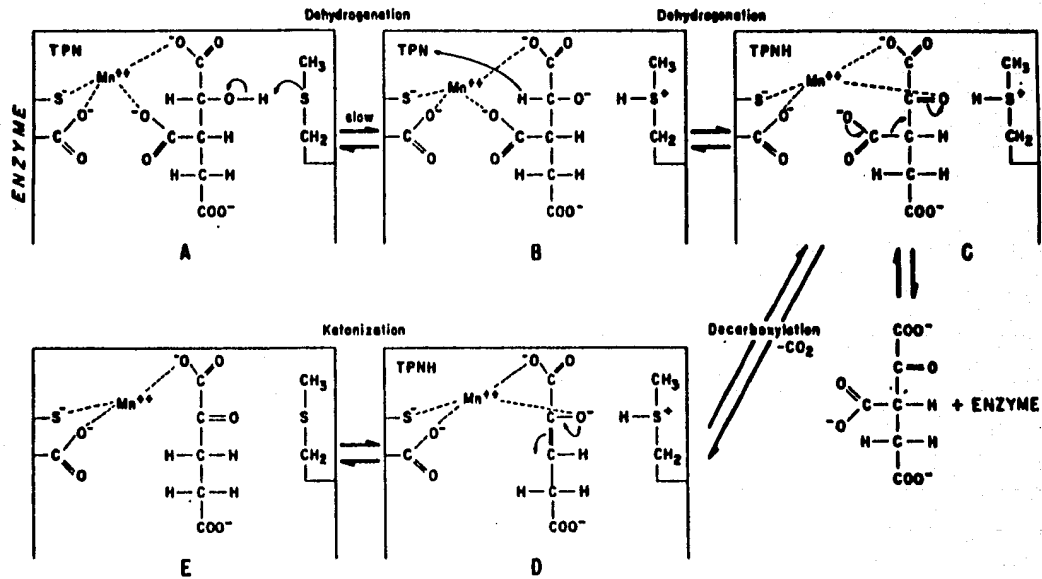


FIGURA I.1 Mecanismo para la oxidación de isocitrato catalizada por la deshidrogenasa isocítrica NADP específica. (Colman, 1975)

catalizada por la enzima NADP-IDH (Colman, 1975). Otro mecanismo de catálisis para la enzima IDH ha sido propuesto por Walsh (1979).

Las propiedades regulatorias de la enzima NAD específica no han sido bien entendidas y no se ha asignado una función metabólica clara a ninguna de las isozimas NADP específicas. Así, ellas han sido el tema de considerable interés con objeto de esclarecer sus papeles metabólicos. Sin embargo, los resultados de muchos estudios, han sido interpretados de diferentes maneras, y existe un considerable desacuerdo entre varios autores en relación al papel de las enzimas NADP específicas (mitocondrial y citoplásmica) y su relativa contribución hacia la oxidación de isocitrato para la producción de energía.

Kaplan et al (1953) ha mostrado que en la mitocondria, la reducción de NAD por isocitrato ocurre sólo cuando NADP esta presente. Esto sugiere un sistema de transhidrogenación entre NAD y NADP, que incluye a la deshidrogenasa isocítrica NADP específica. Además, Kaplan et al (1956) mostró que la oxidación de isocitrato en presencia de NADP no resulta en fosforilación; sin embargo, en presencia de NAD y NADP ocurre fosforilación. Por lo tanto, la oxidación de NADH y NADPH procede a través de diferentes vías en la mitocondria del hígado de la rata, y su función es donar equivalentes reductores hacia la cadena respiratoria. Los

mismos resultados fueron obtenidos por Ernster y Navazio (1956, 1957), Stein et al (1959), y Tager (1966). Los trabajos de Goebell y Klingenberg (1963a, 1963b, 1964) han demostrado convincentemente que en mamíferos, pájaros e insectos, ambas deshidrogenasas isocítricas NAD y NADP específicas juegan un papel importante en la oxidación de isocitrato, pudiendo ser la ruta principal a través de la enzima NAD-IDH. Las dos vías son:

Isocitrato $\xrightarrow{\text{NAD-IDH}}$ NADH \longrightarrow Cadena Respiratoria
 Isocitrato $\xrightarrow{\text{NADP-IDH}}$ NADPH $\xrightarrow{\text{Transhidrogenasa}}$ NADH \longrightarrow
 Cadena Respiratoria.

Goebell y Kinglenberg (1964) suponen un papel especial para cada una de estas enzimas. La enzima NAD-IDH es parte de la función normal en el ciclo de ácido tricarbóxico en la oxidación total de sustratos para la generación de energía en forma de fosfato y la enzima NADP-IDH está envuelta en los procesos sintéticos consumidores de hidrógeno. En base a las diferencias en especificidad de tejido y localización intracelular de las isozimas NADP-IDH del ratón, Henderson (1965) también sugiere que en la mitocondria el NADP reducido por la enzima NADP-IDH es utilizado en respiración via transhidrogenación de nucleótido de piridina.

Stein et al (1967) mostró que la vía de transhidrogenación de NADP-IDH para la oxidación de isocitrato predomina en la mitocondria de hígado y corazón de mamíferos,

y que la vía a través de la enzima NAD-IDH predomina en la mitocondria del cerebro e hígado. Estudios cinéticos de la enzimas mitocondriales NAD-IDH y NADP-IDH en el hígado de la rata (Nichols y Garland, 1967) indicaron que la NAD-IDH contribuye con el 50-70% de la oxidación de isocitrato en la mitocondria para la cadena respiratoria. La tasa adicional de oxidación de isocitrato es contribuida por la enzima NADP-IDH a través del sistema de transhidrogenación. Otra posibilidad para el control de NAD-IDH pudiera ser un desplazamiento del equilibrio de isocitrato al otro lado de la membrana mitocondrial interna, resultando en una disminución de la concentración de isocitrato mitocondrial.

En estudios bioquímicos comparativos de las isozimas NADP-IDH de ratón, Pegoraro y Lee (1979) concluyeron que sus datos son consistentes con la vía citoplásmica-mitocondrial propuesta por Kaplan (1972), siendo la forma mitocondrial mas favorable para la reducción de α -cetoglutarato que la forma citoplásmica. Atkinson (1977), Purich y Fromm (1972) y Colman (1975) sugieren que la regulación de ambas IDH NAD Y NADP NAD Y NADP específicas por medio de controles cinéticos, tales como la razón NADP/NADPH o NADH/NADPH, puede ser una característica regulatoria importante bajo condiciones in vivo. En la mitocondria de los tejidos de corazón de rata, cerebro e hígado, la vía para la oxidación de isocitrato, incluyendo a la deshidrogenasa isocítrica NADP específica,

dependerá de la relación entre las actividades de la enzima NAD-IDH y la enzima NADP-IDH-sistema de transhidrogenación, en cada tejido (Chico et al, 1977).

En adición, Mc Cormack y Denton (1981) mostraron que en la mitocondria de los tejidos de vertebrados la enzima IDH ligada a NAD, ha adquirido la propiedad de ser sensible a la regulación por Ca^{2+} . Este ión permite que agentes extrínsecos tales como hormonas regulen la tasa del ciclo del ácido tricarbóxico sin la necesidad de que existan grandes cambios en la cociente de concentración de ATP/ADP y NADH/NAD en la mitocondria. Un ejemplo del efecto de hormonas y vitaminas sobre la actividad de la deshidrogenasa isocítrica en la rata es dado por Ya.Kon' y Shirina (1981). Ellos encontraron que las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas tanto mitocondrial como citoplásmica son selectivamente influidas por vitaminas y hormonas. Estos resultados indican que la interacción de retinol con enzimas se asocia con su influencia selectiva sobre la actividad de isozimas individuales NADP-IDH. Esta influencia puede ser basada en los efectos alostéricos del retinol, el cual evidentemente juega un papel importante en los efectos biológicos de la vitamina A.

Lowenstein (1961) ha mostrado que las reacciones del ciclo del ácido cítrico de acetato a α -cetoglutarato, el cual genera NADPH, puede ocurrir en la fracción citosólica del

hígado de rata. Aunque la principal capacidad oxidativa de isocitrato por la enzima NADP-IDH en las células del hígado de rata es encontrada en la fracción extramitocondrial (Pet- te, 1966), y la generación de NADPH por la NADP-IDH estimula la síntesis de ácidos grasos, sin embargo, este efecto puede ser reemplazado por otros sistemas de regeneración de NADPH (Hulsmann et al, 1966). Henderson (1965) sugiere que la NADP-IDH del ratón puede funcionar en la regulación de los niveles de NADP oxidado y reducido en las fracciones celulares mitocondrial y del sobrenadante, y que el NADPH generado por la enzima citoplásmica puede ser utilizado en la síntesis de ácidos grasos. Lehninger (1975) también indica que en los mamíferos la NADP-IDH citoplásmica produce NADPH para la síntesis de ácidos grasos.

En la glándula mamaria de vacuno, Bauman et al (1970) y Farrell (1980) reportaron que la deshidrogenasa isocítrica NADP-IDH es la fuente principal de NADPH requerida en la síntesis de novo de grasas. Esta hipótesis se funda en los hallazgos de que en ausencia de glucosa, la utilización de acetato para síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria es varias veces mayor que la encontrada en los tejidos mamaros de la rata. Los bajos niveles de actividad de la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato y la ausencia de una vía de desdoblamiento del citrato excluye la generación de NADPH por estos medios. En el mejillón Mytilis edulis,

ambos tejidos del manto y de la glándula digestiva están asociados con el metabolismo de los lípidos, y la enzima NADP-IDH es un suministrador importante de NADPH necesario en la síntesis de lípidos (Gabbott y Head, 1980). Un análisis de tipo genético bioquímico sugiere que la deshidrogenasa isocítrica NADP específica genera al menos un 20% del NADPH utilizado en lipogénesis durante los estadios de desarrollo de Drosophila (Geer et al, 1976). El músculo rojo de la anguila Anguila rostrata tiene altas actividades de NADP-IDH la cual es una fuente importante de NADPH para la síntesis de ácidos grasos (Aster y Moon, 1977).

Head y Gabbott (1980) encontraron que la enzima NADP-IDH de la glándula digestiva de Mytilus edulis es fuertemente inhibida por la adición simultánea de glioxilato y oxaloacetato. En la mayoría de las bacterias, incluyendo E. coli, sólo se presenta la deshidrogenasa isocítrica NADP específica. Se cree que esta enzima es la tasa limitante para el ciclo del ácido tricarboxílico (Garnak y Reeves, 1979). En aquellos organismos que son capaces de metabolizar acetato como la fuente de carbón vía el ciclo del glioxilato (Lehninger, 1975; Kornberg, 1966), isocitrato es el sustrato común para las enzimas NADP-IDH y la liasa isocitrato. Otra evidencia de la posible función reguladora de la enzima IDH en bacterias, incluye la observación de la inhibición de la deshidrogenasa isocítrica con glioxilato y oxaloacetato com-

binados, en E. coli (Shio y Ozaki, 1968); en Acinetobacter calcoaceticus (Kleber y Aurich, 1976) y en Crithidia fasciculata (Marr y Weber, 1969). Los mecanismos reguladores probablemente incluyen una modificación covalente de la enzima. En la mitocondria del hígado de rata también se ha observado inhibición de la deshidrogenasa isocítrica NAD específica con glioxilato y oxaloacetato combinados (Ruffo et al, 1966).

En algunos músculos de vertebrados e invertebrados, las actividades de ambas NAD-IDH y NADP-IDH son bajas. Esto sugiere que los músculos usan energía a una tasa muy baja. En los músculos de insectos, la energía generada vía el ciclo del ácido tricarbóxico es producida por la enzima NAD específica porque la NADP-IDH muestra baja actividad. Algunos músculos de vertebrados e invertebrados dependen grandemente de la NADP-IDH para la formación de energía durante períodos sostenidos de actividad mecánica (pájaros), y la NAD-IDH se usa en la oxidación de isocitrato en el ciclo del ácido tricarbóxico cuando los músculos están en descanso (Alp et al, 1976). En los músculos del vuelo en los insectos, la NAD-IDH cataliza una reacción en no-equilibrio, mientras que en otros músculos ambas reacciones catalizadas por la NAD-IDH y NADP-IDH están casi en equilibrio (Newsholme y Start, 1973).

Gumbmann y Tappel (1962) demostraron la presencia de de las enzimas del ácido tricarbóxico en la mitocondria de

pez. Esto fue más tarde substanciado por varios investigadores (ver revisión de Hochachka, 1969); sin embargo, la enzima NAD-IDH no ha sido cuidadosamente examinada en los peces. Crabtree y Newsholme (1970) sugieren que en los músculos del pez, la deshidrogenasa isocítrica NADP específica juega un papel importante en la oxidación de sustratos en el ciclo del ácido tricarbóxico, pues la enzima NAD-IDH se presenta en muy bajas cantidades y es inestable.

En estudios sobre las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas a temperaturas cálidas y frías en el pez dorado, Kanungo y Prosser (1974) mostraron que la oxidación de isocitrato en la mitocondria del hígado del pez está vinculada a la enzima NADP-IDH debido a las razones bajas de P/O obtenidas en los experimentos de fosforilación oxidativa con las mitocondrias del hígado. Esto es similar a la oxidación de isocitrato por la NADP-IDH en el ciclo del ácido cítrico de la mitocondria de hígado de mamíferos.

Con objeto de esclarecer el papel de la oxidación de isocitrato y el control del ciclo del ácido tricarbóxico en los peces, Moon y Ouellet (1979) examinaron la oxidación de varios sustratos exógenos agregados a mitocondrias intactas aisladas del hígado de la anguila americana Anguilla rostrata. Ellos concluyeron que el control del ciclo del ácido tricarbóxico es logrado por las actividad del sistema de transhidrogenación NADPH:NAD, que envuelve a la NADP-IDH. La

ausencia de la enzima NAD-IDH confirma sus observaciones. En contraste, Mc Cormack y Denton (1981) mostraron la presencia de la deshidrogenasa isocítrica NAD específica en el corazón de la trucha, y que ésta es activada y regulada por el Ca^{2+} .

Ya que los datos provistos por la mayoría de los investigadores reflejan la complejidad del mecanismo de regulación de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica y que no existe información disponible al respecto en isozimas IDH purificadas de peces, las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas del teleósteo Fundulus heteroclitus fueron candidatos lógicos para su evaluación funcional.

DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICA DE
Fundulus heteroclitus:

Previos estudios en este sistema enzimático (Cashon et al, 1981; Van Beneden et al, 1981) han mostrado que Fundulus heteroclitus tiene tres loci Idh dependientes de NADP: Idh-A, Idh-B y Idh-C. Ambas Idh-A y Idh-B son polimórficas, con tres y cinco alelos respectivamente. El tercer locus Idh-C es monomórfico y es el único locus Idh expresado en el músculo blanco. Este no se encontró en el hígado. EL locus principal del hígado (Idh-B) se encuentra localizado en el citoplasma y el locus Idh-A en la matriz de la fracción mitocondrial. EL locus del músculo (Idh-C) es también una isozima mitocondrial.

Los estudios genéticos no han mostrado un eslabón estrecho entre los loci Idh-h. La variación espacial en la frecuencia de genes para los loci polimórficos Idh-A y Idh-B han mostrado que existe una variación clinal en la frecuencia de los alelos, con fijación de homocigotos para un alelo en latitudes del Norte y variación genética en latitudes del Sur (Cashon et al, 1981). Las frecuencias alélicas de Idh-BC y Idh-CC en Maine, US. (44.01 latitud °N) son 0.990 y 1.0 respectivamente. Estos datos indican que los peces colectados en Maine tienen esencialmente una isozima alélica para cada uno de los loci Idh. Así, los peces de Maine fueron una buena fuente de isozimas IDH-BC₂ y IDH-AC₂.

4. METAS DE LA TESIS:

La presencia de tres formas enzimáticas IDH-NADP en Fundulus heteroclitus plantea dos diferentes preguntas: 1) ¿Existen diferencias físicas y funcionales significativas entre las isozimas IDH ?

2) ¿Existe variación en las relaciones estructura-función entre las isozimas alélicas de loci sintetizadores de proteínas individuales IDH ?, i.e., ¿son las isozimas alélicas no equivalentes?.

Esta tesis intenta contestar la primera pregunta. La tarea fue realizada mediante el examen de la distribución de la isozimas en los tejidos, junto con su purificación y ca-

racterización. Las propiedades catalíticas de cada una de las isoformas IDH fueron examinadas en función de la temperatura y el pH por medio de métodos cinéticos de estado constante (steady-state kinetics).

CAPITULO II

ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS DE
Fundulus heteroclitus (L.): DISTRIBUCION EN TEJIDOS,
PURIFICACION Y CARACTERIZACION.

A. INTRODUCCION

Las enzimas existen en múltiples formas moleculares en las fracciones mitocondrial y citoplásmica de extractos de tejido. La deshidrogenasa isocítrica dependiente de NADP ocurre en dos formas comunmente referidas como mitocondrial (m-IDH) y citoplásmica (c-IDH). Una encuesta en varias especies (mamíferos, insectos, peces, etc.) ha revelado que ambas c-IDH y m-IDH contienen ya sea un solo locus o múltiples loci. Henderson (1965) mostró dos loci genéticos en los tejidos del ratón, un locus en la mitocondria y otro en el citoplasma. En los insectos Phormia regina (Mc Ginnis et al, 1956) y Culex pipiens (Cheng et al, 1977), y la bacteria E. coli (Reeves et al, 1968) dos isozimas NADP-IDH, distintas electroforéticamente, han sido descritas. En peces como arenque y esferínque, existe también evidencia de un locus mitocondrial y un locus citoplásmico para la NADP-IDH (Quiroz-Gutierrez and Ohno, 1969).

La presencia de múltiples loci-IDH parece ser un fenómeno común en muchos organismos. Múltiples loci-IDH han sido descritos en el frijol de soya Glycine max (Yong et al, 1981) y en los hongos Oomycetes (Wang and LeJohn, 1974). Katz and Kalow (1965) mostraron cinco isozimas NADP-IDH en tejidos humanos. Bell and Baron (1964) describieron multiples loci-IDH en tejidos de rata. En el hígado del raton

Mus musculus molossinus fueron encontradas tres tipos de isozimas NADP-IDH. Dos de ellas se encuentran principalmente en el extracto mitocondrial y una en la fracción citoplásmica (Minezawa et al, 1980). En el salmón, las isozimas mitocondrial (m-IDH) y citoplásmica (c-IDH) están controladas por dos loci, un monomórfico y un polimórfico para cada una de ellas (Kijima and Fujio, 1977). La NADP-IDH del salmón del Atlántico Salmo salar (Cross and Payne, 1977) tiene dos isozimas en el citoplasma del hígado y una isozima en la mitocondria del corazón. Otros ejemplos de múltiples loci genéticos para NADP-IDH han sido descritos en el pez Xiphophorus sp (Siciliano and Wright, 1973), en la trucha arcoiris Salmo gairdneri (Allenfdorf and Utter, 1973; Reinitz, 1977), en la trucha parda Salmo trutta L.(Taggart et al, 1981) y la anguila japonesa (Taniguchi and Numachi, 1978). En el teleósteo Fundulus heteroclitus, la deshidrogenasa isocítrica NADP específica tiene múltiples loci genéticos (Van Beneden et al, 1981).

Este capítulo trata sobre la distribución de tejido, aislamiento, purificación y caracterización física de las isozimas IDH-NADP de pez teleósteo Fundulus heteroclitus.

B. MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos Químicos:

Acido isocítrico (DL), tris (hidroximetilo amino metano), metosulfato de fenazina, nitrotetrazolio azul, almidón hidrolizado, sulfato de laurilo (SDS), azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol, Y-pironin, β -mercaptoetanol deshidrogenasa isocítrica de corazón de puerco altamente purificada y proteínas usadas como marcadores moleculares fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. El tubo de diálisis fue obtenido de VWR Scientific INC. N-N' - metileno bis acrilamida (Bis), N,N,N',N'- tetra metileno diamina (TEMED), Affi-gel azul (malla 100-200), y reactivo colorante para determinación de proteína fueron obtenidos de Bio Rad Lab. La acrilamida fue obtenida de Eastman Kodak Co. Sulfato de Amonio ultrapuro fue comprado de Schwars/Mann. Las celulosas DE-52 y CM-52 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals. Anfolito transportador pH 3.5 a 10 fue de LKB Produkter AB. Los demás reactivos químicos usados fueron grado analítico. Agua desionizada y destilada (Bantam Demineralizer BD-1 and Cartridge Barnstead D0803, Corning AG3 destiller) fue usada para preparar todas las soluciones acuosas.

2. Especímenes:

Los peces fueron capturados con trampas usando como carnada mejillón triturado o trozos de pez y/o pollo. Las

áreas de colecta fueron: Bahía de Chesapeake, Maryland, USA y Wiscasset, Maine, USA. Cuando los peces fueron matados en el campo, estos fueron decapitados. Los hígados fueron extraídos y congelados de inmediato en nitrógeno líquido hasta ser usados. Cuando los peces fueron transportados vivos al laboratorio, los hígados fueron extraídos y procesados de inmediato. El músculo blanco fue disectado de peces adultos y fue congelado en nitrógeno líquido hasta ser utilizado. Los hígados de peces colectados en Wiscasset, Maine, fueron nuestra fuente de isozimas IDH-B₂ y IDH-A₂, ya que las frecuencias del gene para los alelos "c" de ambas isozimas es 0.990 y 1.0 respectivamente (Cashon et al, 1981). Los peces de ambas localidades fueron nuestra fuente de isozima muscular (IDH-C₂), ya que esta es monomórfica.

3. Cristalería:

Toda la cristalería fue lavada con detergente tipo Alconox Lab o ácido crómico, enjuagada exhaustivamente con agua destilada y secada en el horno a 110°C. La cristalería usada para la purificación y ensayos de enzimas fue sumergida en una solución de EDTA 1 mM y enjuagada con agua destilada.

4. Sistemas Amortiguadores (Buffers):

Buffer para homogeneizar hígados: Tris/citrato 20 mM pH 7.5, conteniendo Na₂SO₄ 0.3 M, MnSO₄ 1 mM y glicerol al 10% (v/v).

Buffer para aislar mitocondrias: Tris/ Cl^- 50 mM pH 7.5, conteniendo β -mercaptoetanol 5mM y sacarosa .25M.

Buffer para: homogeneizar músculo, diálisis, cromatografía de afinidad y correr columnas de celulosa DE-52 y Sephacel DEAE: tris/citrato 10 mM pH 8.0, conteniendo MnSO_4 1 mM y glicerol al 10% (v/v).

Buffer para columnas de Sephadex G-150 y G-200: tris/citrato 20 mM pH 7.0, conteniendo Na_2SO_4 0.3M, NaCl 0.1 M, MnSO_4 1 mM y glicerol al 10% (v/v).

Buffer para columna de celulosa CM-52: K^+ /ácido 2-(N-morfolino etanosulfónico) pH 6.5, conteniendo glicerol al 15% (v/v), MnSO_4 1mM y β -mercaptoetanol 1 mM.

Buffer para almacenar extractos puros de enzima: tris/citrato 100 mM pH 7.5, conteniendo Na_2SO_4 0.3 M y glicerol al 50% (v/v). La concentración de todos los amortiguadores está expresada en términos de la concentración del anión.

Buffer para electroforesis en gel de almidón: tris (0.75 M) y citrato (0.25 M) ajustado a pH 9.0 (solucion concentrada).

Buffer para teñir geles de almidón y poliacrilamida: tris/ Cl^- 0.2 M pH 8.0.

5. Nomenclatura de Isozimas:

La nomenclatura usada en esta tesis para las isozimas NADP-IDH está basada en la movilidad electroforética relativa de las múltiples formas de esta enzima como ha sido descrito con anterioridad en estudios de IDH en Fundulus heteroclitus (Van Beneden et al, 1981; Cashon et al. 1981).

A las isozimas (loci) se les asignó letra mayúscula. El locus Idh-A corresponde al de migración más lenta (más catódico) en el sistema de gel de almidón empleado. El locus Idh-B corresponde al de migración más rápida (más anódico) en el gel. El tercer locus Idh-c migra cerca de la posición del locus Idh-B y se traslapa con el alelo "d" del locus Idh-B. A las variantes (alelos) observadas en el hígado se les asignó superíndices con letra minúscula, siendo el más anódico "a", luego "b", etc. Los fenotipos son indicados con letras mayúsculas: IDH-A₂, IDH-B₂ y IDH-C₂ y se representan como Idh-A, Idh-B y Idh-C cuando se describen sus propiedades genotípicas.

6. Distribución de isozimas en tejidos:

Con objeto de determinar la distribución de las diferentes isozimas IDH en los tejidos del pez Fundulus heteroclitus, se llevó a cabo un análisis electroforético con homogenados de tejido de los órganos de varios peces.

a. Preparación de tejido. Los tejidos de 8 peces adultos fueron disectados. Hígado, músculo blanco, corazón, bazo, intestino, cerebro, aleta, branquia, ojo, testículo, ovario, células sanguíneas y suero (0.2g) fueron suspendidos por separado en 0.5 ml de buffer tris/citrato 10 mM pH 7.0 conteniendo MnSO₄ 1 mM y glicerol al 10% (v/v). Las células, se destruyeron por vibración ultrasónica (Heat Systems-Ultrasonic, Inc.) en tres intervalos de 15 segundos

cada uno. El sonificador se fijó a 50 watts. Muestras de los homogenizados fueron colocadas en tubos capilares y centrifugadas por tres minutos en una microhematocentrífuga (Damon/IEC Division) para remover desechos y lípidos.

b. Electroforesis en gel de almidón. La enzima deshidrogenasa isocítrica fue resuelta sobre gel de almidón horizontal de 15 x 33 cm en el sistema buffer tris/citrato pH 6.9 de Whitt (1970). Se agregó β -mercaptoetanol 5 mM (Place and Powers, 1978), sacarosa al 10% (p/v), triton X-100 al 0.4% (Van Beneden et al, 1981) y glicerol al 10% (v/v) para lograr una mejor resolución del locus Idh-A. El gel de almidón consistió de 78 g de almidón hidrolizado en 500 ml de una mezcla de 60 g de sacarosa, 9 ml de buffer tris/citrato pH 6.9, 2 gotas de β -mercaptoetanol, 2.5 ml de triton X-100 y 50 ml de glicerol, aforado a un volumen final de 530 ml con agua destilada-desionizada.

El buffer electrodo consistió de 50 ml de tris/citrato pH 6.9 aforado a 1 litro con agua destilada. El contacto del buffer con el gel se hizo colocando una esponja en cada orilla del gel. Las muestras se cargaron sobre pedacitos de papel filtro Whatman de 5 x 7 mm y se colocaron en el gel en una ranura cortada a 10 cm de la orilla catódica del gel. La electroforesis fue generalmente ejecutada a 4°C por 20 horas, a 35 miliampers y 325 volts usando fuentes de poder regulado (Heathkit IP-2717) de alto voltaje. Los geles se rebanaron horizontalmente con un alambre de guitarra.

c. Métodos de teñido:

1) Actividad de IDH-NADP.

Cada rebanada de gel fue teñida para actividad de deshidrogenasa isocítrica NADP específica, a 37°C por una hora de acuerdo al método de Shaw y Prasad (1970). La mezcla de reacción contuvo 10 mg de NADP, 10 mg de NBT, 2 mg de PMS, 65 mg de DL isocitrato (sal de sodio) y 65 mg de $MnCl_2$ en 50 ml de buffer para teñir (pH 8.0). Los geles se enjuagaron con agua destilada y se fijaron y guardaron en una solución de ácido acético-metanol-agua (1:5:5).

2) Actividad de IDH-NAD.

La mezcla para teñir la actividad de deshidrogenasa isocítrica NAD específica NAD contuvo 15 mg de NAD, 25 mg de ADP, 10 mg de NBT, 2 mg de PMS, 65 mg de DL-isocitrato y 65 mg de $MnCl_2$ en 50 ml de buffer para teñir (pH 8.0). Cuando esta mezcla de teñir fue usada, los tejidos del pez se homogeneizaron en buffer tris/citrato 10 mM pH 7.0, conteniendo glicerol al 10% (v/v) y ADP 2 mM.

d. Ensayo enzimático para actividad de IDH-NAD.

Con objeto de detectar la actividad de la enzima NAD-IDH en los diferentes tejidos del pez, el siguiente sistema buffer fue utilizado: trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4, conteniendo DL isocitrato 4 mM, $MnSO_4$ 2 mM, NAD 2 mM y ADP 2 mM. La reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm (Beckman Acta III) a través

de la formación de NADH. Muestras de homogeneizado fueron usadas en estos ensayos.

7. Tratamiento de columnas de intercambio iónico, afinidad y filtración en gel:

Las celulosas de intercambio iónico DE-52 y CM-52 fueron tratadas de acuerdo al Boletín de Información Whatmann (Leaflet IL2). Cada una de las columnas se equilibró pasando de 10 a 12 volúmenes de buffer a través de ellas. El pH (pH Meter Model 26 Radiometer/Copenhagen) y conductividad (Conductivity Meter Type CDM2e, R/C) de los extractos de enzima fueron igualados al mismo pH y conductividad del buffer. Los geles se descartaron después de usados. Como la capacidad de adsorción de los geles varía de acuerdo a la talla de la proteína, conformación, distribución de carga y la presencia de otras proteínas en el extracto (Scopes, 1981), una cantidad apropiada de celulosas fue usada: 1 cm³/20-30 mg de proteína (Davies y Scopes, 1981).

El Affi-gel azul (malla 100-200) fue generalmente equilibrado antes de ser usado con 5 volúmenes de buffer, y usado en la proporción de 5 ml de volumen del gel/20 mg de proteína. Después de cada corrida, el gel fue lavado con dos volúmenes de NaCl 1 M, regenerado con 2 volúmenes de urea 6 M, seguido por 8 volúmenes del buffer adecuado. Azida de sodio a 0.02% fue agregada para evitar bacterias cuando el gel era almacenado. Las columnas de Sephadex G-150 y G-200, y

Sephacel DEAE se prepararon de acuerdo a Fischer (1971). Los geles se lavaron con buffer después de ser usados y se almacenaron en el cuarto frío con azida de sodio al 0.02%.

8. Determinación de Proteína:

La concentración de proteína fue determinada espectrofotométricamente por el método de Bradford (1976) usando el reactivo colorante de Bio Rad Lab. Deshidrogenasa isocítrica de puerco altamente purificada fue utilizada como estandar. La concentración de proteína también fue determinada por medio de la absorbancia de las muestras, detectada espectrofotométricamente a 280 nm, usando el coeficiente de extinción reportado para IDH de hígado de puerco ($E \cdot 1\%_{280nm} = 1.27$) (Illingworth y Tipton, 1970).

9. Ensayo Enzimático:

En todas las etapas de purificación, la actividad de la enzima se ensayo a temperatura ambiente, siguiendo la reducción de NADP a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman Acta III. La mezcla de reacción (1 o 3 ml) consistió de buffer trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4, conteniendo DL isocitrato 4 mM, NADP 1 mM y $MnSO_4$ 2 mM (Seelig y Colman, 1977). La reacción fue iniciada con la adición de enzima. Una unidad de actividad enzimática cataliza la reducción de 1 μ mol de NADP/min. Esta mezcla de reacción se identifica en esta tesis como "solución sustrato estándar".

10. Precipitación Fraccionada con Sulfato de Amonio:

Con objeto de determinar la cantidad adecuada de sal para precipitar la enzima deshidrogenasa isocítrica de extractos crudos, ésta se precipito a diferentes intervalos de saturación salina. El pH fue continuamente controlado y ajustado con NaOH 2 N durante el proceso de precipitación. La precipitación se efectuó en un baño de hielo mientras la solución se agitaba suavemente con un agitador magnético. Los precipitados se removieron por centrifugación (Sorvall Super-speed RC2-B) y se resuspendieron en el buffer para diálisis. La actividad de la enzima y la concentración de proteína fueron determinadas para cada intervalo de saturación. Se escogieron cinco intervalos en incrementos de 20%, de 20 a 100%.

11. Purificación de las Isozimas:

A. Isozimas hepáticas.

Con objeto de purificar las isozimas deshidrogenasa isocítrica del hígado, se intentó primero separarlas aislando las mitocondrias del sobrenadante, cuando se contaba con material fresco. Cuando los hígados fueron congelados las isozimas se procesaron juntas en la mayoría de los pasos de purificación y se separaron por cromatografía de intercambio catiónico en celulosa CM-52 casi hasta el final del procedimiento de purificación.

a. Aislamiento de mitocondrias:

Los hígados frescos fueron sumergidos en buffer frío conteniendo sacarosa. Se enjuagaron seis veces agitando suavemente con una varilla de vidrio para eliminar sangre. El tejido fue homogeneizado eléctricamente (Homogenizer Bodin Electric Co.) sin forzar el tejido entre las paredes del tubo y el pistón en rotación. La suspensión fue centrifugada por 20 minutos a 750 x g. El sobrenadante se filtró dos veces a través de gaza para eliminar la grasa y capa blanda, después se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 28,000 x g. El sobrenadante contiene la isozima citoplásmica (IDH-B₂) y el precipitado la isozima mitocondrial (IDH-A₂). Las mitocondrias se resuspendieron en buffer con sacarosa conteniendo NaCl 0.6 M y fueron centrifugadas a 28,000 x g por 15 minutos. Este paso se repitió tres veces con objeto de eliminar cualquier IDH soluble. El precipitado final fue tratado en tres formas distintas para romper las mitocondrias: shock hipotónico al resuspenderlas en buffer de baja fuerza iónica; por vibración ultrasónica en 3 intervalos de 15 segundos cada uno, con períodos de enfriamiento en agua de hielo; y por congelación en nitrógeno líquido seguido de descongelación. La suspensión se centrifugó a 15,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante contiene la isozima mitocondrial (IDH-A₂).

La isozima citoplásmica fue purificada como se describe más adelante. La isozima mitocondrial se pasó a

través de Affi-gel azul y celulosa CM-52 para eliminar impurezas. La enzima fue usada para determinaciones de masa molecular y en estudios de estabilidad térmica. Con objeto de verificar si ambas isozimas se separaron completamente una de otra, se llevó a cabo una inspección visual tiñendo la actividad de cada enzima en geles de almidón como se describe en la sección de distribución en tejidos.

b. Separación y purificación.

Los hígados (25g) se descongelaron y sumergieron en buffer frío, en la proporción de 10g de hígado por 50 ml de buffer. El tejido se homogeneizó eléctricamente (Bodin Electric Co.). Los residuos se eliminaron por centrifugación a 750 g x 20 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una doble capa de gaza para eliminar lípidos y la capa blanda. Al sobrenadante fue agregado sulfato de amonio para dar una solución al 35% de saturación. El pH fue controlado con NaOH 2 N. El sobrenadante fue mantenido en agitación continua a 5-10°C, y posteriormente centrifugado por 20 minutos a 27,000 x g en el rotor SS-34 de una centrifuga Sorvall (Superspeed RC2-B).

EL precipitado conteniendo muy poca actividad enzimática fue descartado. Al sobrenadante fue agregado mas sulfato de amonio para dar una solución al 80% de saturación. La solución fue mantenida en agitación por una hora a 4°C y el precipitado fue recuperado centrifugando a 27,000 x g

por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado redissuelto en 60 ml del buffer para diálisis. El extracto resultante fue dializado por 18 horas contra tres cambios de 2 litros de buffer cada uno. El material desnaturalizado fue eliminado por centrifugación y la solución que contenía ambas isozimas citoplásmica (IDH-B₂) y mitocondrial (IDH-A₂) fue aplicada a una columna de celulosa DEAE-52 (3.7 x 14 cm reteniendo 80 g de gel prehinchado) previamente equilibrada. La columna fue corrida con el buffer a un flujo de 30 ml/hr, colectando fracciones de 4 ml.

La actividad enzimática fue encontrada exclusivamente en el volumen vacío. Las fracciones colectadas conteniendo actividad enzimática, fueron de aplicadas de inmediato a la columna de Affi-gel azul (1.7 x 30.5 cm) previamente equilibrada. La columna se lavó con buffer a un flujo de 32 ml/hr. Cuando la absorbancia a 280 nm fue baja y constante, ambas isozimas fueron eluidas del gel con un "pulso" de NADP 2 mM equivalente a un volumen de la columna. Las fracciones combinadas, conteniendo la actividad de la deshidrogenasa isocítrica, mostraron un pico agudo. El extracto fue concentrado a un volumen mínimo por medio de ultrafiltración usando membranas de Amicón tipo PM-10 a una presión de 40 psi con argón. El buffer fue cambiado repitiendo este proceso varias veces. Después de cambiar el

buffer el extracto fue aplicado de inmediato a una columna de celulosa CM-52 (1.3 x 8 cm) previamente equilibrada. La isozima citoplásmica (IDH-B₂) apareció en el volumen vacío, mientras que la isozima mitocondrial (IDH-A₂) fue adsorbida en el gel. Cuando la absorbancia a 280 nm fue lo suficientemente baja, fue aplicado un gradiente salino (NaCl 0-0.1 N) para eluir a la enzima adsorbida. Solamente aquellas fracciones con actividad enzimática fueron combinadas y de inmediato dializadas en el buffer para almacenaje. El extracto fue guardado en el congelador y posteriormente usado en estudios de caracterización y cinética enzimática.

La enzima citoplásmica que fue eluida en el volumen vacío de la columna de celulosa CM-52 fue aplicada a una columna de sephadex G-150 (2.6 x 70 cm) previamente equilibrada y calibrada. La proteína se eluyó a un flujo de 20 ml/hora, manteniendo el eluyente a una presión hidrostática de 30 cm de altura. Fracciones de 3 ml fueron colectadas y sólo aquellas con actividad específica constante y alta fueron combinadas. El extracto así obtenido fue concentrado y dializado por 10 horas contra el buffer para almacenaje. El extracto fue congelado y utilizado posteriormente en estudios de caracterización y cinética enzimática.

Con objeto de checar la separación completa de las isozimas, se hizo una inspección visual de éstas por medio de la formación de azul de formazán en las regiones de actividad

enzimática después de correr una electroforesis en gel de almidón. El procedimiento de teñido fue descrito anteriormente en la sección de distribución de tejido. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo en el cuarto frío.

B. Isozima Muscular.

El músculo blanco (30g) fue descongelado y macerado en buffer frío con una licuadora. Los pasos de purificación fueron esencialmente los mismos que se siguieron en la purificación de IDH-B₂ del hígado hasta la cromatografía de afinidad en Affi-gel azul. Una columna de Sephacel DEAE (1 x 12 cm), previamente equilibrada, fue usada como el paso final en la purificación de la isozima muscular. El extracto concentrado fue aplicado a la columna y eluido con el buffer a un flujo de 7.0 ml/hora. Cuando la absorbancia a 280 nm fue baja y constante, la isozima fue eluida con 80 ml de un gradiente salino (NaCl 0-0.1 N). La isozima fue eluida de inmediato y las impurezas fueron retardadas en el gel. Las fracciones con actividad enzimática fueron combinadas y dializadas. El extracto se mantuvo congelado hasta que fue utilizado en estudios de caracterización y cinética enzimática. La Figura. 2.1 muestra un esquema describiendo los principales pasos en la purificación de las isozimas muscular y hepáticas.

12. Determinación de peso molecular:

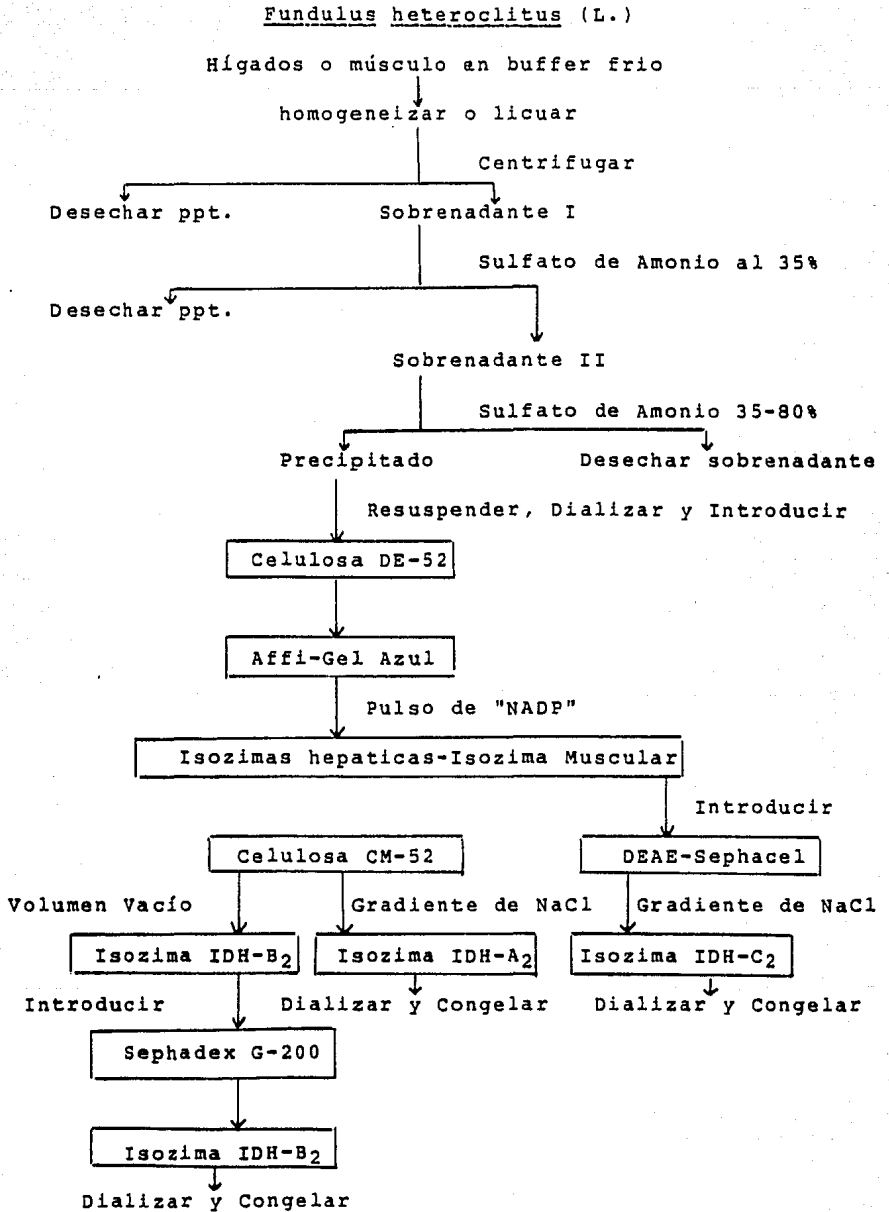


FIGURA 2.1 Carta esquemática de los principales pasos de purificación de las isozimas NADP-IDH.

El peso molecular nativo fue determinado por filtración en gel empleando una columna de sephadex superfino G-200 de 2.6 x 72 cm. La columna de cromatografía descendente fue adecuadamente equilibrada. El flujo fue de 20 ml/hora y la presión hidrostática se mantuvo a una altura de 30 cm. Las muestras fueron aplicadas por medio de una válvula de tres vías conectada a una bomba peristáltica, y seguidas por un volumen igual de buffer conteniendo glicerol al 20% (v/v). La calibración de la columna fue efectuada con las siguientes proteínas estándar: aldolasa (156 K), albúmina de suero de bovino (67 K), albumina de huevo (45 K), α -quimiotripsinogeno (25 K), mioglobina (17 K) y deshidrogenasa alcohólica (141 K), a una concentración inicial de 20 mg/ml. Fracciones de 3.2 ml fueron colectadas con un colector de fracciones (LKB/BROMMA 7000 ULTRORAC). El volumen vacío (V_0) fue determinado con azul Dextran 2000 y el volumen interno (V_i) con glicilglicina. La absorbancia a 280 nm se determinó para cada fracción. El volumen de elución relativo y el coeficiente de partición, K_{av} , fueron calculados para los estándares y las isozimas IDH.

El peso molecular de las subunidades y la pureza de las preparaciones fue determinada por electroforesis. Se prepararon geles de poliacrilamida al 8 y 10% de acrilamida, conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS). Los geles fueron preparados en placa (Bio Rad Model 220), o en tubos (0.6 X 10

cm) (Disc Electrophoresis Unit, Savant Instruments, Inc.) de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970). Las siguientes proteínas estándar fueron usadas: albúmina de suero de bovino (67 K), dehidrogenasa L-glutamato (53 K), albúmina de huevo (45 K), aldolasa (39 K) y α -quimiotripsinogeno (25 K). Las bandas de proteína en los geles fueron teñidas y desteñidas usando el procedimiento de Fairbanks et al (1971). Después de desteñir los geles, éstos fueron examinados a 580 nm usando un Scanner 2 para geles acoplado a un espectrofotómetro Beckman Acta III con registrador continuo. La movilidad de las bandas fue calculada en relación al colorante indicador azul de bromofenol o pironin-Y. Estándares internos (albúmina de huevo-aldolasa y albúmina de suero de bovino-aldolasa) fueron incluidos también en las muestras.

Electroforesis de disco bajo condiciones de no desnaturalización fue también llevada a cabo en tubos (0.6 x 10 cm) con acrilamida al 7.5% usando el método descrito por Laemmli (1970). Glicerol al 10% (v/v) fue incluido en la mezcla del gel y en el buffer electrodo. La electroforesis fue llevada a cabo a 2 mA/tubo por 4.30 horas a 4°C. Los geles fueron teñidos ya sea para actividad enzimática (Shaw and Prasad, 1970) a 37°C, y fijados en ácido acético al 10% (v/v). Los geles se examinaron con un scanner a 580 nm.

13. Isoelectroenfoque:

Con objeto de determinar los puntos isoeléctricos de las isozimas muscular y hepática, fue llevado a cabo un isoelectroenfoque en una columna preparativa de 110 ml (LKB-8100) de acuerdo al manual de LKB (LKB Produkter AB, Bromma, Sweden), usando como medio estabilizador un gradiente de glicerol. La resolución de las proteínas se logró en un gradiente de pH 3 - 10 (LKB Ampholine 8141), a 600 volts entre 32 y 48 horas. La temperatura se mantuvo a 4°C con una unidad refrigerante (Savant Instruments). La solución gradiente densa fue preparada con agua, anfolito y glicerol al 60% (v/v) y la ligera con agua y anfolito. Las soluciones electrodo se prepararon con el cátodo en la parte superior de la columna. Al final de la corrida se colectaron fracciones de un ml. La absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática fueron determinadas para cada fracción. El gradiente de pH se reconstruyó midiendo el pH de cada fracción. Este método de isoelectroenfoque fue también utilizado para separar las isozimas del hígado.

14. Diálisis, concentración y almacenaje de muestras:

La diálisis fue llevada a cabo en tubo de celulosa para diálisis (VWR) cuando se consideraba conveniente, antes de un subsecuente paso de purificación. El tubo de diálisis fue tratado de acuerdo a Brewer et al (1974), con el objeto de eliminar metales pesados, proteasas y nucleasas.

La concentración de extractos fue siempre realizada

por el método de ultrafiltración usando un sistema Amicon con membranas PM-10 a una presión de 40 psi con argón (Amicon Corporation).

El tejido y homogenados crudos fueron siempre almacenados en nitrógeno líquido hasta ser usados. Las isozimas purificadas fueron rutinariamente dializadas en buffer con glicerol al 50% (v/v) y almacenadas en el congelador.

15. Estudios de estabilidad térmica:

Con el objeto de investigar posibles diferencias estructurales entre las isozimas, fueron llevados a cabo estudios de desnaturalización térmica. Alíquotas de enzima fueron colocadas en tubos de 6 x 50 mm por triplicado e incubadas por 20 minutos en un baño de agua a la temperatura deseada (Ultrathermostat K6/Colora, Messtechnik GMBH Lorch/Wurtt). El buffer usado para diluir la enzima fue tri-etanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4, conteniendo BSA al 1%. Después de calentar las alíquotas, fueron enfriadas de inmediato sobre hielo y ensayadas con la "solución sustrato estándar" para determinar la actividad enzimática remanente.

El control (0°C) fue usado para calcular la actividad fraccional remanente después de la incubación. Las siguientes temperaturas de incubación fueron empleadas: 25°, 30°, 33°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55° y 60°C. Con objeto de determinar el efecto de la presencia del sustrato en el

proceso de inactivación proteica, la incubación de las isozimas fue también realizada en presencia de DL-isocitrato 4 mM. La temperatura de incubación se extendió a 70°C para una incubación adicional de la isozima IDH-B₂. En algunos experimentos con la isozima muscular (IDH-C₂) el efecto del metal (MnSO₄ 2 mM) y el cofactor (NADP 1 mM) fue también investigado.

La cinética de la desnaturalización térmica fue también estudiada, incubando las isozimas a temperatura constante y a intervalos de tiempo de 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. El control (0°C) fue incubado por tiempos idénticos. El buffer, materiales y cálculos fueron hechos como se describió anteriormente. Las isozimas del hígado (IDH-A₂ y IDH-B₂) fueron incubadas a 50°C. La isozima del músculo (IDH-C₂) fue incubada a 42°C debido a su marcada inestabilidad a mayor temperatura. La temperatura de incubación fue escogida arriba del T₅₀ (temperatura a la cual el 50% de la actividad enzimática permanece después de 20 minutos de incubación).

Estos estudios fueron también llevados a cabo a 37°, 40°, 43° y 45°C para la isozima IDH-C₂. Experimentos de incubación a 45°C en presencia de cofactor (NADP 1 mM) o sustrato (DL-isocitrato 4 mM) fueron también realizados para observar el efecto de estos sobre la cinética de inactivación térmica de la isozima muscular.

C. RESULTADOS

1. Distribución en tejidos:

Los resultados de la distribución de las isozimas IDH en los tejidos de varios individuos son mostrados en la Tabla 2.1 Patrones enzimáticos consistentes fueron obtenidos en la mayoría de los tejidos, excepto intestino, en el cual una o dos bandas híbridas aparecieron entre los loci Idh-A y Idh-B. Esto se debió probablemente a la formación de sub-bandas entre el locus mitocondrial (Idh-A), que es muy inestable, y los otros loci.

El locus Idh-C predomina en la mayoría de los tejidos. Este locus, previamente descrito como dominante en músculo blanco (Van Beneden et al, 1981), también parece dominar en bazo, testículo y corazón. El locus Idh-B predomina en hígado e intestino, pero también estuvo presente en cerebro, branquia, ojo, ovario y aleta. El locus Idh-A es expresado solamente en hígado e intestino. Como ninguno de los loci Idh apareció en el suero sanguíneo, se concluyó que la deshidrogenasa isocítrica no existe en este fluido. La Figura 2.2a (A,B,C) muestra la distribución en tejido y la especificidad para los diferentes loci Idh de tres diferentes individuos que fueron homocigotos para el locus Idh-B del hígado. La Figura 2.2b muestra los polimorfismos más comunes encontrados en los loci Idh-A y Idh-B del hígado de catorce individuos.

TABLA 2.1 DISTRIBUCION DE LAS ISOZIMAS IDH EN LOS
TEJIDOS DE Fundulus heteroclitus.

TEJIDO	L O C U S		
	A	B	C
HIGADO	+++	+++	-
INTESTINO	+++	+++	+++
BAZO	-	-	+++
CORAZON	-	-	+++
BRANQUIA	-	++	+++
ALETA	-	+	+++
MUSCULO	-	-	+++
OJO	-	+	+++
CEREBRO	-	++	+++
OVARIO	-	+	+++
TESTICULO	-	-	+++
CSR	-	-	+++
SUERO	-	-	-

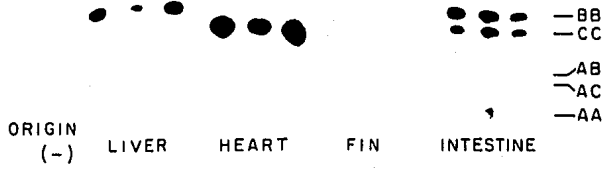
Nota: Las frecuencias relativas son designadas con el símbolo +, la isozima más frecuente es representada con +++, y la ausencia de isozimas es representada con -.

CSR = Células sanguíneas rojas

FIGURA 2.2A Distribución específica de los loci Idh en los tejidos de Fundulus heteroclitus. Los tejidos fueron disectados de individuos homocigotos para el alelo BC_2 del locus Idh-B del hígado. Se observó hibridización entre los loci tipo A- y B-, y A- y C- de las isozimas IDH en los tejidos del intestino. El locus tipo C dominó en la mayoría de los tejidos.

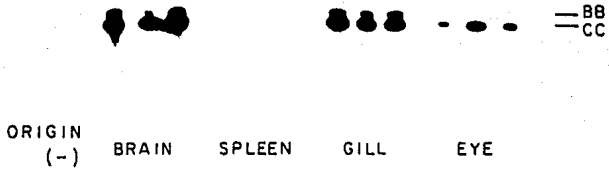
(+)

(A)



(+)

(B)



(+)

(C)

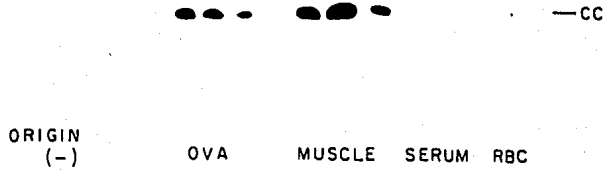
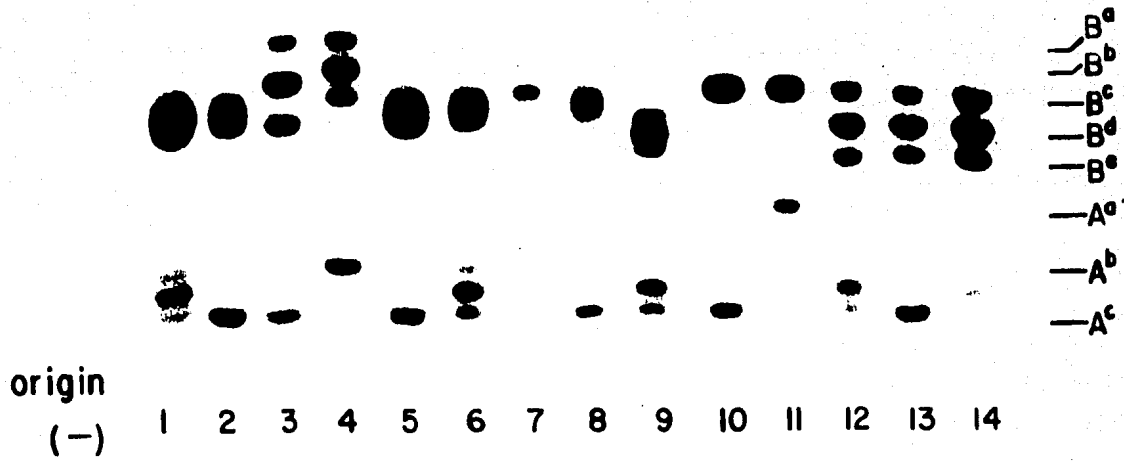


FIGURA 2.2B Análisis representativo de los homogenados de hígado de Fundulus heteroclitus teñidos para actividad de IDH, mostrando los fenotipos comunes para los loci Idh-A y Idh-B de catorce individuos. Los fenotipos son:

- 1) IDH-A^bA^c, IDH-B^cB^d; 2) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^d;
- 3) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^e; 4) IDH-A^bA^b, IDH-B^aB^c;
- 5) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^d; 6) IDH-A^bA^c, IDH-B^cB^d;
- 7) IDH-B^cB^c; 8) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^d;
- 9) IDH-A^bA^c, IDH-B^dB^e; 10) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^c;
- 11) IDH-A^aA^a, IDH-B^cB^c; 12) IDH-A^bA^c, IDH-B^cB^e;
- 13) IDH-A^cA^c, IDH-B^cB^e;
- 14) IDH-A^bA^c, IDH-B^cB^e.

(+)



2. Detección de la deshidrogenasa isocítrica dependiente de

NAD:

La deshidrogenasa isocítrica dependiente de NAD no se reveló al teñir geles de almidón. Sin embargo, cuando los homogeneizados crudos de cada tejido fueron preparados e inmediatamente ensayados para actividad enzimática, todos los extractos de tejido mostraron actividad en el siguiente orden relativo: corazón > testículo > hígado > cerebro > intestino > branquia > ojo > músculo > suero > aleta > bazo.

La Tabla 2.2 muestra la actividad relativa ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$) de NAD-IDH obtenida de los extractos de tejido. Debido a la pequeña talla de algunos tejidos e inestabilidad de la enzima, no fue factible hacer un estudio cuantitativo. Sin embargo, estos datos demuestran la presencia de la deshidrogenasa isocítrica NAD específica en los tejidos de Fundulus heteroclitus.

3. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio:

La actividad máxima soluble de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica a diferentes concentraciones de sulfato de amonio es expresada en la curva de la Figura 2.3 y los datos de la Tabla 2.3. En consecuencia, cada precipitación con sulfato de amonio fue rutinariamente realizada en dos pasos: una precipitación con sulfato de amonio al 35% de saturación y una segunda precipitación al 80% de saturación.

4. Purificación de las isozimas de hígado y músculo:

TABLA 2.2 ACTIVIDAD* "RELATIVA" DE LA DESHIDROGENASA
ISOCITRICA NAD-ESPECIFICA.

TEJIDO	uM NAD ⁺ /min/ml
CORAZON	.0800
TESTICULO	.0557
HIGADO	.0511
CEREBRO	.0486
INTESTINO	.0410
BRANQUIA	.0300
OJO	.0150
MUSCULO	.0140
SUERO	.0140
ALETA	.0124
BAZO	.0073
C S R	ND

* Los datos son expresados en ml de extracto crudo para cada tejido. El nivel actual de actividad enzimática puede cambiar.

ND: No determinada

CSR: Células Sanguíneas Rojas

FIGURA 2.3 Precipitación fraccionada con sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] a 4°C en buffer tris/citrato 10 mM pH 7.4 conteniendo MnSO₄ 1 mM y glicerol al 10% (v/v) de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de Fundulus heteroclitus.

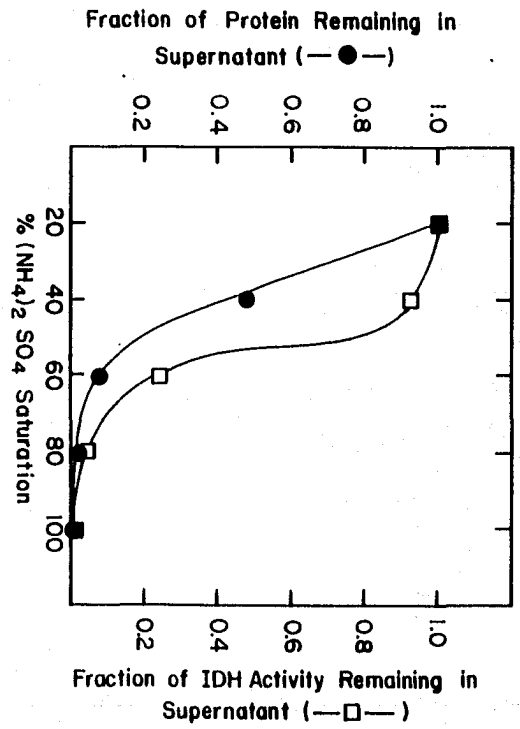


TABLA 2.3 PRECIPITACION DE LA DESHIDROGENASA ISOCITRICA
NADP-ESPECIFICA (IDH-B₂) CON (NH₄)₂SO₄

PORCENTAJE DE SULFATO DE AMONIO A 0°C	FRACCION DE PROTEINA RE- MANENTE EN EL SOBRENADANTE	FRACCION DE ACTIVIDAD DE IDH REMANENTE EN EL SOBRE- NADANTE.
%	%	%
0 - 20	1.00	1.00
20 - 40	0.48	0.93
40 - 60	0.08	0.24
60 - 80	0.02	0.05
80 - 100	0.01	0.01

La purificación de la isozima IDH-B₂ resultó en una preparación con una actividad específica de 78 U/mg de proteína. Ya que la isozima IDH-A₂ fue rutinariamente purificada junto con IDH-B₂, fue difícil estimar la cantidad relativa de actividad enzimática contribuida por IDH-A₂. Además, tanto la baja proporción de IDH-A₂ en el hígado con respecto a IDH-B₂, así como su alta inestabilidad, hizo difícil calcular la cantidad total de esta isozima presente en los extractos puros. Una estimación de la actividad específica, obtenida de diferentes extractos purificados, dio valores en el rango de 6.2 a 10 U/mg de proteína. La Tabla 2.4 resume el procedimiento de purificación y los datos obtenidos de las isozimas del hígado (IDH-B₂) y músculo (IDH-C₂). La Figura 2.4 muestra un cromatograma representativo del Affi-gel azul obtenido en la purificación de las isozimas IDH.

La separación individual de las isozimas IDH del hígado del extracto previamente obtenido después de cromatografía de afinidad, es mostrado en el perfil de elución obtenido de la columna de celulosa CM-52 (Figura 2.5). La isozima citoplásmica (IDH-B₂) fue eluida en el volumen vacío, y la mitocondrial (IDH-A₂), que es adsorbida en el gel, fue eluida con un gradiente de NaCl.

La Figura 2.6 ilustra un perfil de elución de IDH obtenido de la columna de Sephadex G-150. La Figura 2.7

TABLA 2.4 ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE LAS ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS DE Fundulus heteroclitus (L).

IDH-B₂ (HIGADO)

PASO DE PURIFICACION	VOLUMEN ml	PROTEINA mg	ACTIVIDAD TOTAL (U)	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg	PURIFICACION (VECES)	RENDIMIENTO %
HOMOGENIZADO CRUDO	98	2729.00	193	0.071	1.00	100
CELULOSA DE-52	16	340.00	173	0.509	7.17	90
AFFI-GEL AZUL	3	3.00	45	15.000	211.00	23
CELULOSA CM-52	3.5	1.60	32	20.000	282.00	17
SHEPHADEX G-150	2.3	0.13	10	78.000	1099.00	5

IDH-C₂ (MUSCULO)

PASO DE PURIFICACION	VOLUMEN ml	PROTEINA mg	ACTIVIDAD TOTAL (U)	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg	PURIFICACION (VECES)	RENDIMIENTO %
EXTRACTO CRUDO	100	1190.00	122	0.103	1.0	100
CELULOSA DE-52	36	194.00	83	0.428	4.0	68
AFFI-GEL AZUL	3	0.666	17	25.500	248.0	14
SEPHACEL-DEAE	9	0.133	11	83.000	806.0	9

FIGURA 2.4 Perfil representativo de la columna de Affi-gel azul mostrando la elución de la enzima IDH con un "pulso" de NADP 2 mM. Buffer: tris/citrato 10 mM pH 8.0, conteniendo $MnSO_4$ 1 mM y glicerol al 10% (v/v).

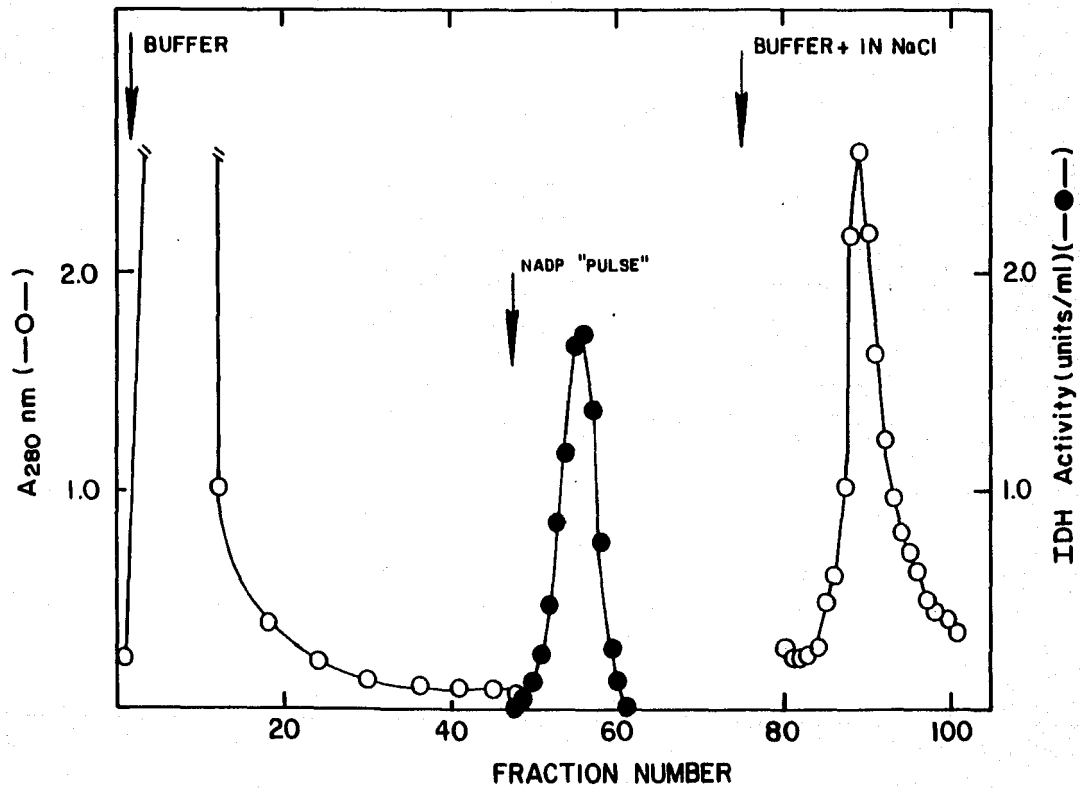


FIGURA 2.5 Cromatografía de intercambio catiónico de las isozimas IDH-B₂ y IDH-A₂ sobre celulosa CM-52. El perfil de elución muestra la separación de las isozimas del hígado (B). La elucion de la isozima IDH-A₂ fue lograda con un gradiente de NaCl (0 - 0.1 N) (A). El buffer utilizado fue: K⁺/MES pH 6.5 10 mM conteniendo glicerol al 15% (v/v), MnSO₄ 1 mM y -mercaptoetanol 1 mM.

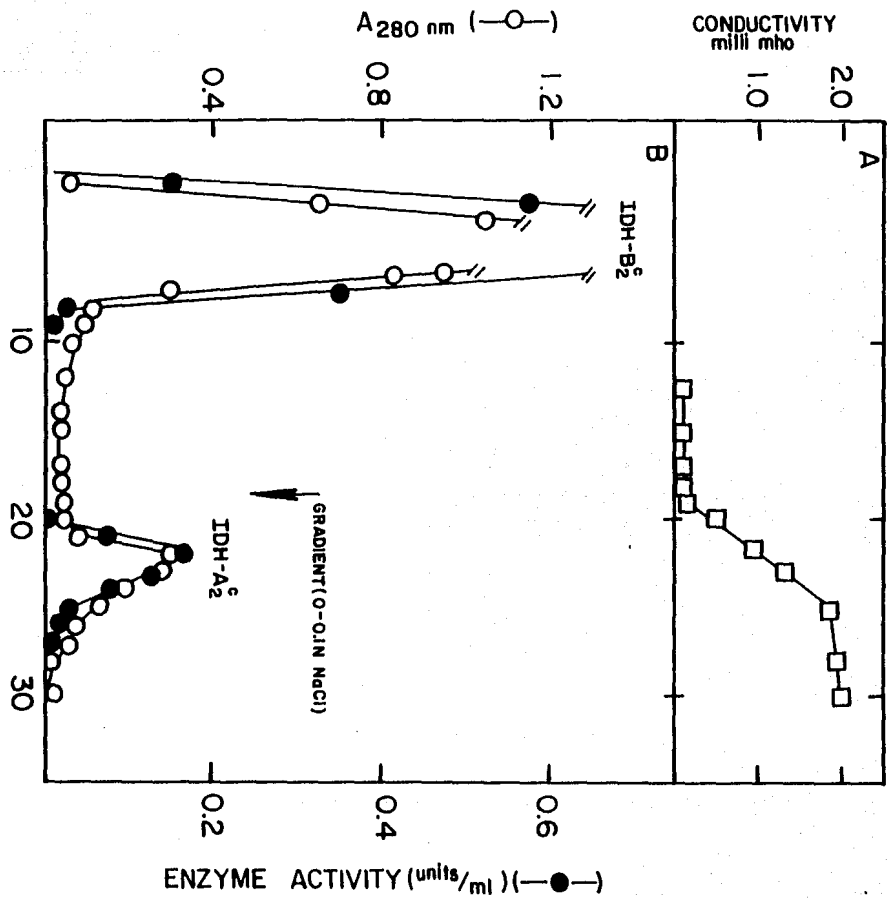
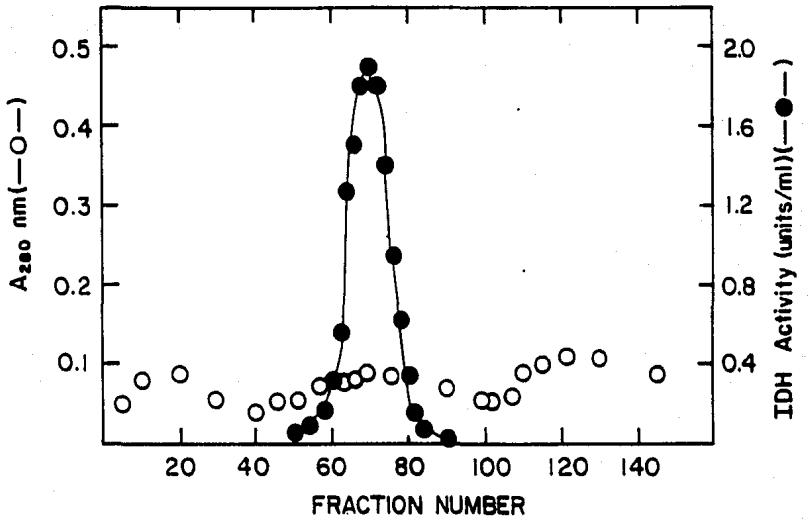


FIGURA 2.6 Perfil de elución representativo para la deshidrogenasa isocítrica de la columna de filtración en gel Sephadex G-150. El buffer utilizado fue: tris/citrato 20 mM pH 7.0 conteniendo Na_2SO_4 0.3 M, NaCl 0.1 M, MnSO_4 1 mM y glicerol al 10% (v/v). Las condiciones de la columna se describen en Métodos.



muestra un perfil de la columna de Sephacel DEAE de un extracto de músculo, ilustrando la elución de IDH-C₂ con un gradiente de sal y su separación de otras proteínas contaminantes.

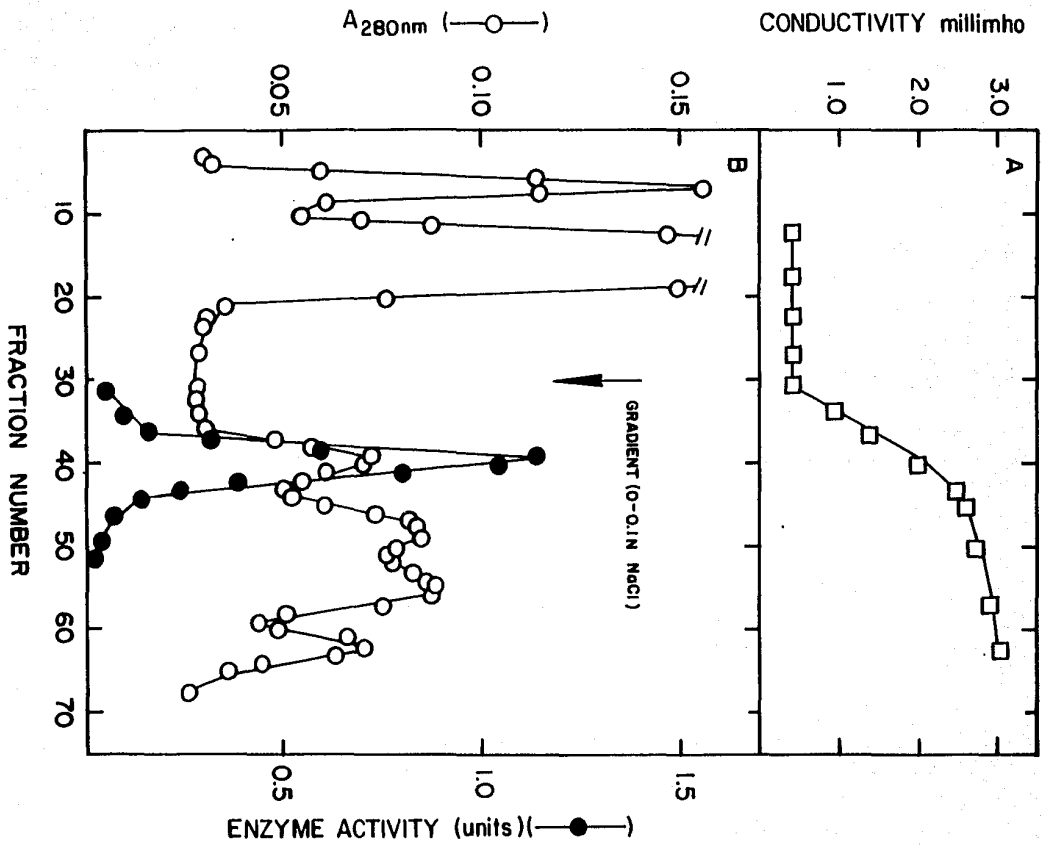
5. Criterios de pureza:

El criterio usado para determinar la homogeneidad de las isozimas IDH fueron: homogeneidad sobre las base de actividad específica constante de los extractos puros, después de ser recromatografiados sobre filtración en gel de Sephadex; homogeneidad sobre la base de electroforesis en condiciones de desnaturalización (SDS) y no desnaturalización; y homogeneidad sobre la base de carga eléctrica después de isoelectroenfoque de los extractos purificados.

Cuando las preparaciones de enzima purificada fueron recromatografiadas en gel de Sephadex G-150, la actividad específica casi no cambió. Algunas veces fue observada una disminución de la actividad específica de las isozimas mitocondriales, debido a su marcada inestabilidad.

Cuando las isozimas purificadas fueron sujetas a electroforesis de disco bajo condiciones de desnaturalización (SDS) en geles de acrilamida al 8%, 10% y 12%, las isozimas migraron como una sola banda cuando los geles fueron teñidos para proteína. La figura 2.8 muestra las fotografías y registros densitométricos de dos geles de poliacrilamida en

FIGURA 2.7 Perfil de cromatografía de intercambio aniónico para la isozima IDH-C₂ sobre Sephacel DEAE (B). La isozima fue eluida con un gradiente de NaCl (0-0.1 N) (A). El Buffer utilizado fue: tris/citrato 10 mM pH 8.0 conteniendo MnSO₄ 1 mM y glicerol al 10% (v/v). Las condiciones de la columna se describen en Métodos.



disco al 10% corridos con 20 ug de IDH-B₂ y IDH-C₂ respectivamente, y un gel con 8% de acrilamida corrido con 15 ug de IDH-A₂. La estimación de pureza se hizo calculando el área bajo los picos. En base a estos datos, las preparaciones resultaron: 98% pura para IDH-B₂ y 95% pura para IDH-C₂. Los geles corridos con 8% de acrilamida dieron los mismos resultados. por lo tanto la homogeneidad de las proteínas cubre los requisitos de pureza dados por Hendrick y Smith (1968), cuando se usan diferentes concentraciones de gel.

El registro densitométrico de la isozima IDH-A₂ mostró una pureza de aproximadamente 87%. Se hicieron varios intentos de purificar la enzima a una mejor resolución; sin embargo, no fue posible, ya que se obtuvo una pérdida total de la actividad enzimática.

Como IDH-A₂ se encuentra en menor proporción con respecto a IDH-B₂, y es altamente inestable bajo las diferentes condiciones usadas en todos los pasos de purificación, se consideró que el nivel de pureza obtenido (87%) era adecuado para hacer los estudios de caracterización y cinética enzimática.

Cuando las isozimas purificadas IDH-B₂ y IDH-C₂ fueron sujetas a electroforesis en condiciones de no desnaturalización, dieron una banda de proteína y una de actividad enzimática. La figura 2.9 muestra las fotografías y registros densitométricos de geles de poliacrilamida al 7.5%

FIGURA 2.8 Registros densitométricos y fotografías de tres geles de SDS-poliacrilamida examinados a 580 nm. Contienen una banda de proteína pura para cada una de las isozimas IDH de Fundulus heteroclitus. Las flechas en los registros muestran la posición del colorante indicador (pironin-Y). Los geles se corrieron de izquierda a derecha.

- A) 15 ug de IDH-A₂ (gel al 8%)
- B) 20 ug de IDH-B₂ (gel al 10%)
- C) 20 ug de IDH-C₂ (gel al 10%)

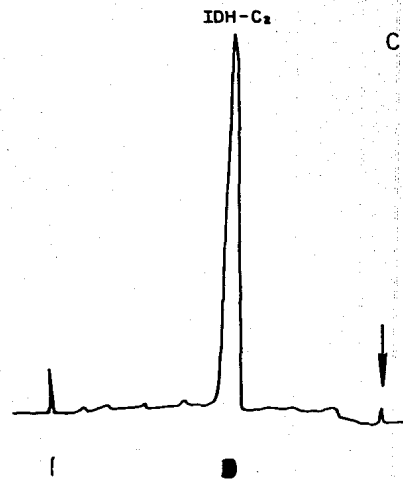
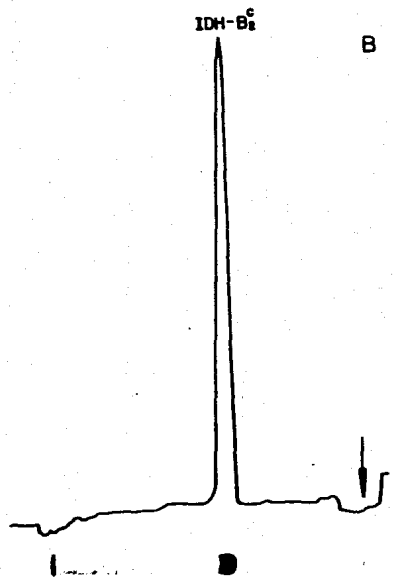
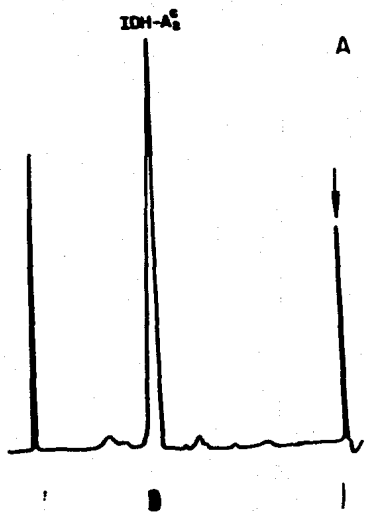
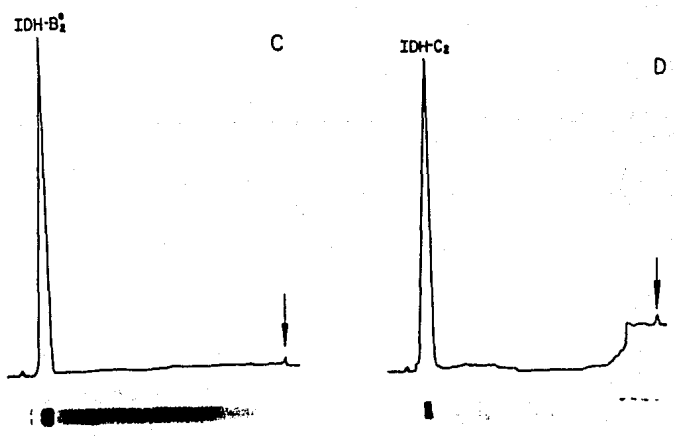
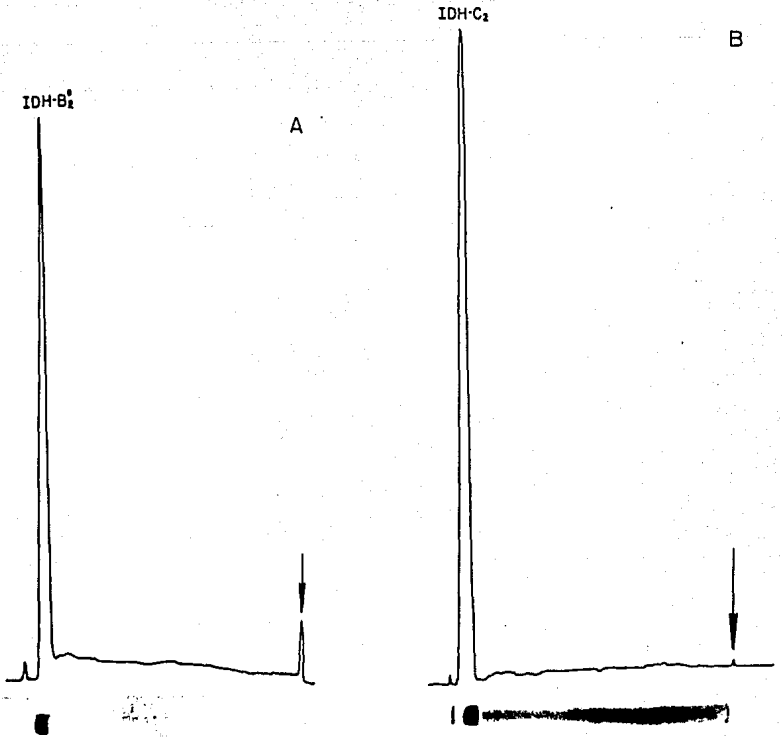


FIGURA 2.9 Registros densitométricos y fotografías de cuatro geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones de no denaturalización conteniendo a las isozimas purificadas IDH-B₂ y IDH-C₂ del hígado y músculo respectivamente. Las flechas en los registros muestran la posición del colorante indicador azul de bromofenol.

- A) IDH-B₂ teñida para proteína
- B) IDH-C₂ teñida para proteína
- C) IDH-B₂ teñida para actividad enzimática
- D) IDH-C₂ teñida para actividad enzimática

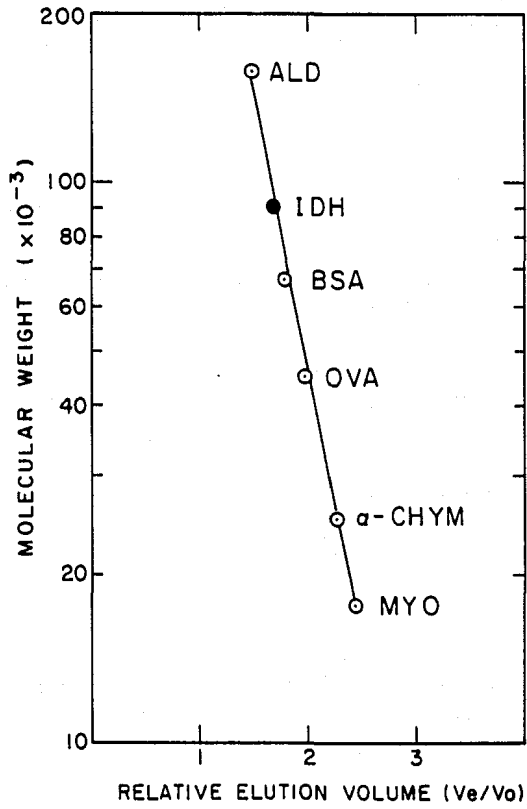


de las isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂ respectivamente. La mezcla de los geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones de no desnaturalización fue suplementada con glicerol al 10%. Esta modificación fue crítica para la resolución de las bandas de actividad enzimática después de ser teñidas. Cuando el glicerol fue omitido, no se observó actividad de IDH en los geles, después de acoplar la reacción de NADP a la producción de formazán. Por lo tanto, el glicerol estabiliza a las proteínas durante el proceso de electroforesis, eliminando la desnaturalización debido a la pérdida gradual de la actividad enzimática. Los geles corridos en ambas condiciones de desnaturalización y no desnaturalización fueron sobrecargados con el extracto purificado en un intento de detectar contaminantes. Sin embargo, ellos mostraron sólo una banda.

6. Determinaciones de peso molecular:

Los pesos moleculares nativos de las isozimas muscular y del hígado, según se determinó por filtración en gel, parecen ser esencialmente idénticas. La masa molecular nativa promedio para las isozimas fue de 90,000 daltones, como se muestra en la Figura 2.10. Los volúmenes de elución relativos determinados experimentalmente (V_e/V_o) versus el logaritmo de las masas moleculares de las proteínas estándar fueron graficados para estimar el peso molecular nativo de cada isozima.

FIGURA 2.10 Gráfica representativa de la determinación del peso molecular nativo de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de Fundulus heteroclitus, por filtración en gel sobre Sephadex G-200. El buffer usado fue tris/citrato 20 mM pH 7.0 conteniendo glicerol al 10% (v/v), $MnSO_4$ 1 mM, Na_2SO_4 0.3 M y NaCl 0.1 M. Flujo: 20 ml/hr.; altura de la presión hidrostática del eluyente: 30 cm; estándares: 20 mg/ml; columna: 2.6 x 72 cm. El círculo negro indica el valor medio del volumen de elución relativo (REV) de tres diferentes determinaciones para cada una de las isozimas NADP-IDH.



La masa molecular de las subunidades de las isozimas fue estimada por comparación de la movilidad de las subunidades de la deshidrogenasa isocítrica con la de las proteínas estándar. La gráfica de los estándares versus el logaritmo de sus masas moleculares indica una masa molecular de las subunidades de $45,000 \pm 3,000$ daltones para las isozimas IDH (Figura 2.11).

La Figura 2.12, muestra las fotografías y registros densitométricos de geles de poliacrilamida conteniendo algunos estándares internos (albúmina de huevo-aldolasa y albúmina de suero de bovino-aldolasa) incluidos con la isozima IDH-B₂. La isozima del hígado emerge junto con el estándar albúmina de huevo (Fig. 2.12A). Las dos se separan en picos agudos de diferente longitud. Los datos obtenidos de estos geles dieron una masa molecular de $45,250 \pm 2500$ daltones para las subunidades de IDH-B₂.

La combinación de ambos pesos moleculares nativo y de las subunidades indica que la deshidrogenasa isocítrica de Fundulus heteroclitus es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas. Estos datos concuerdan con los datos obtenidos de otras fuentes. La enzima de E. coli (Burke et al, 1974), corazón de buey (Mc Farlane et al, 1977), hígado de res (Carlier y Pantaloni, 1973), M. edulis (Head, 1980), R. spheroides (Chung and Braginski, 1972), B. steanothermophilus (Howard and Becker, 1970), y una forma de Acinetobacter

FIGURA 2.11 Gráfica representativa de la determinación del peso molecular de la subunidades de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de Fundulus heteroclitus sobre geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Representa la migración de las proteínas estándar relativas al colorante indicador (R_f) versus el logaritmo del peso molecular. El círculo negro representa el valor promedio de la movilidad relativa de los estandares (R_m) de 4 determinaciones separadas para las isozimas NADP-IDH.

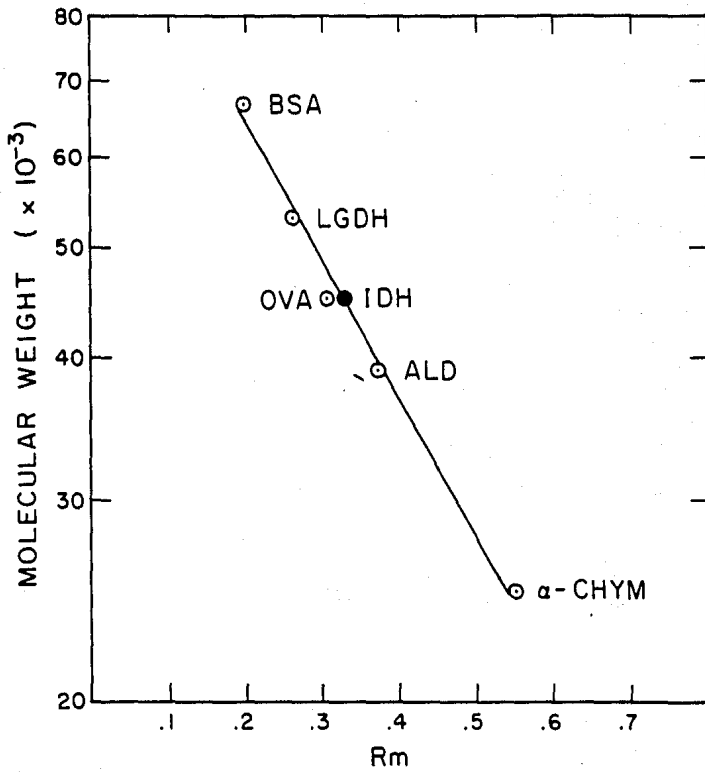
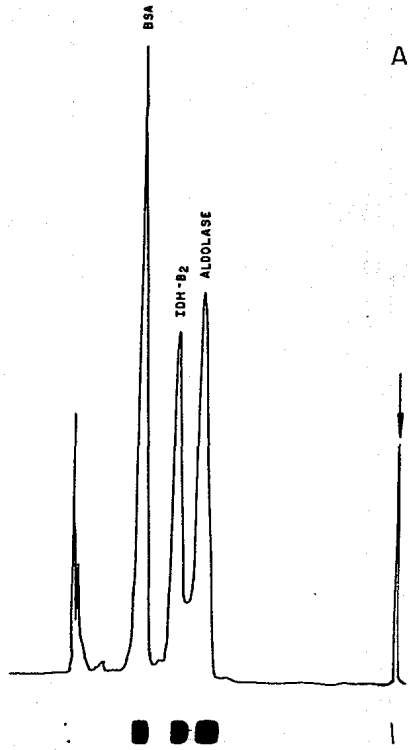


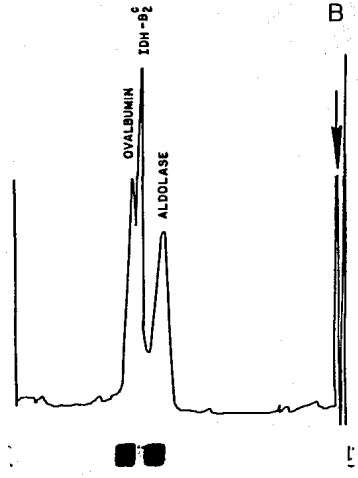
FIGURA 2.12 Registros densitométricos y fotografías de dos geles de poliacrilamida-SDS mostrando algunos estándares internos incluidos con una muestra pura de la isozima IDH-B₂ en la determinación del peso molecular de las subunidades.

A) Albúmina de huevo - IDH-B₂ - Aldolasa

B) Albúmina de Suero de Bovino - IDH-B₂ - Aldolasa.



A



B

lwoffi (Self and Weitzmann, 1972), tiene una masa molecular de aproximadamente 42,000 - 50,000 daltones para la subunidad y aproximadamente 83,000 - 100,000 daltones para la enzima dimérica.

Existen otras fuentes de enzima que han revelado diferencias en pesos moleculares. Valores de 77,000 y 85,000 han sido obtenidos de corazón y riñón de ratón respectivamente, con subunidades de 35,000 daltones (Pegoraro et al, 1979). La enzima dimérica de Drosophila (Williamson et al, 1980) tiene una masa molecular de 110,000 daltones, y la enzima de hígado de puerco (Illingworth and Tipton, 1970) tiene una masa molecular de aproximadamente 75,000 daltones. Formas monoméricas de esta enzima han sido también reportadas en corazón humano (Seelig and Colman, 1978), glándula mamaria de bovino (Farrell, 1980), corazón de puerco (Colman et al, 1970), y Azotobacter vinelandii (Chung and Braginski, 1972), con una masa molecular nativa de 53,000, 55,000, 58,000 y 80,000 daltones respectivamente.

Según la literatura correspondiente lo indica, existe variación entre los pesos moleculares nativo y de las subunidades de la deshidrogenasa isocítrica de varias fuentes. Los pesos moleculares parecen depender en parte del método usado en su determinación. Por ejemplo, en E. coli, Burke et al (1974) encontró que la enzima está compuesta de dos subunidades de 45,000 por medio de electroforesis con

SDS. Sin embargo, cuando se empleó el método de entrecruzamiento con suberimidato de dimetilo seguido de electroforesis con SDS, el valor obtenido fue de 43,000. Vazques y Reeves (1979) mostraron en E. coli una masa molecular de la subunidad de 53,000 por medio de electroforesis con SDS y de 49,900 por análisis de amino ácidos. Carlier y Pantaloni (1973) discuten que los metodos hidrodinámicos tales como filtración en gel o electroforesis dan un valor promedio del peso molecular de la enzima nativa que es siempre menor que los pesos moleculares del dímero determinado por otros métodos. Esto también refleja propiedades relacionadas con la estructura cuaternaria y forma de la molécula (Head, 1980).

En base a estos argumentos, concluimos que las formas diméricas de la deshidrogenasa isocítrica caen en el rango de 45,000 a 53,000 daltones para las subunidades y 85,000 a 100,000 daltones para la masa molecular nativa. La Tabla 2.5 muestra un resumen de algunas propiedades de NADP-IDH de varias fuentes.

7. Isoelectroenfoque:

Los resultados obtenidos de la caracterización de las isozimas con respecto a puntos isoeléctricos (pI), i.e., el pH al cual la carga neta de la proteína es cero, fueron los siguientes: pI 5.19, 7.0 y 5.29 para las isozimas IDH-B₂, IDH-A₂ y IDH-C₂ respectivamente. Las Figuras 2.13A y B ilustran los perfiles de pH y los valores de iso-pH

TABLA 2.5 RESUMEN DE ALGUNAS PROPIEDADES DE LA DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICA DE VARIAS FUENTES.

FUENTE	SUBUNIDAD M.W	NATIVO M.W.	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg P	PURIFI- CACION (VECES)	RENDI- MIENTO %	REFERENCIA	
CORAZON DE PUERCO	60,000	60,000*	12,600	72.8	9.0	Plaut, 1962.	
HIGADO DE PUERCO	-	75,000	46.5	581.0	25.5	Illingworth y Tipton 1970	
<u>Azotobacter vinelandii</u>	80,000	80,000*	133.0	88.7	22.0	Chung & Franzen, 1969.	
CORAZON-RATA	-	-	15.75	98.4	56.0	Islam <u>et al</u> ,	
HIGADO-RATA	-	-	18.46	102.5	25.0	1972.	
<u>Acinetobacter lwoffii</u>	45,000	90,000	-	-	-	Self & Weitzmann, 1972.	
<u>Rodopseudomonas s.</u>	50,000	103,000	48.1	48.1	11.0	Chung & Braginsky, 1972.	
HIGADO RES	48,000	76,000	17.7	550.0	21.0	Carlier & Pantaloni, 1973.	
<u>Bacillus s.</u>	45,000	92,500	3950.0	415.0	21.5	Nagaoka <u>et al</u> , 1977.	
CORAZON DE TORO	45,000	90,000	39.0	20.0	34.0	Mac Farlane <u>et al</u> , 1977.	
CORAZON DE HUMANO	53,000	53,000*	64.0	517.0	47.0	Seelig & Colman, 1978.	
<u>Escherichia coli.</u>	46,900	83,000	56.0	47.0	51.0	Vazques & Reeves, 1979.	
CORAZON Y RINON-RATON	36,000 35,000	77,000 85,000	45.0 40.0	59.0 100.0	23.0 39.0	Pegoraro <u>et al</u> , 1979.	
<u>Drosophila</u>	60,000 50,000	11,000	19.75	94.0	30.0	Williamson <u>et al</u> , 1979.	
GLANDULA MARIA-BOVINO	MA-55,000	55,000*	52.5	170.0	6.1	Farrell, 1980.	
<u>M. edulis</u>	45,000	71,000	26.9	996.0	12.5	Head, 1980.	
<u>Fundulus h.</u>	HIGADO	45,000	90,000	78.0	1099.0	5.0	Esta tesis
MUSCULO	45,000	90,000	83.0	806.0	9.0	Esta tesis	

* Monomeros

de las isozimas del hígado y músculo obtenidos de una columna preparativa de isoelectroenfoque de 110 ml. Este método fue también usado en los pasos de purificación, ya sea para separar las isozimas del hígado o para remover los contaminantes remanentes en las isozimas del hígado y músculo. La Figura 2.14 muestra los registros densitométricos y las fotografías de dos geles de poliacrilamida con SDS conteniendo 15 ug de IDH-B₂ y 10 ug de IDH-C₂ obtenidas después del isoelectroenfoque. Ambos geles dieron una sola banda de proteína.

Los valores de los puntos isoelectrónicos obtenidos para las isozimas IDH fueron comparados con los valores de otros peces y otras fuentes animales (Tabla 2.6). En la tabla, puede verse que nuestros datos concuerdan con los valores de pI de Mytilus edulis (Head, 1980) y la trucha arcoiris (Moon y Hochachka, 1971a). Los puntos isoelectrónicos fluctúan de 4.6 a 7.4, excepto para el corazón de puerco que tiene un pI mayor de 9.0 (Colman, 1968) y S. typhimurium (Marr and Weber, 1973) con un pI de 4.0 a 4.2.

8. Estudios de estabilidad térmica:

a. Inactivación térmica.

Inactivación por calor es un procedimiento comúnmente empleado para la caracterización de la estabilidad estructural de una enzima y para la búsqueda de diferencias estructurales entre las formas múltiples de una

FIGURA 2.13A Perfil de elución de una columna preparativa de isoelectroenfoque corrida con un extracto conteniendo a las isozimas IDH-B₂ y IDH-A₂. Los puntos isoeléctricos (pI) fueron: 5.19 y 7.0 para IDH-B₂ y IDH-A₂ respectivamente. En la parte superior del perfil se muestra el gradiente de pH. Resolución: 32 horas a 600 volts a 4°C.

Actividad de IDH (●); A₂₈₀ nm (○); pH (□)

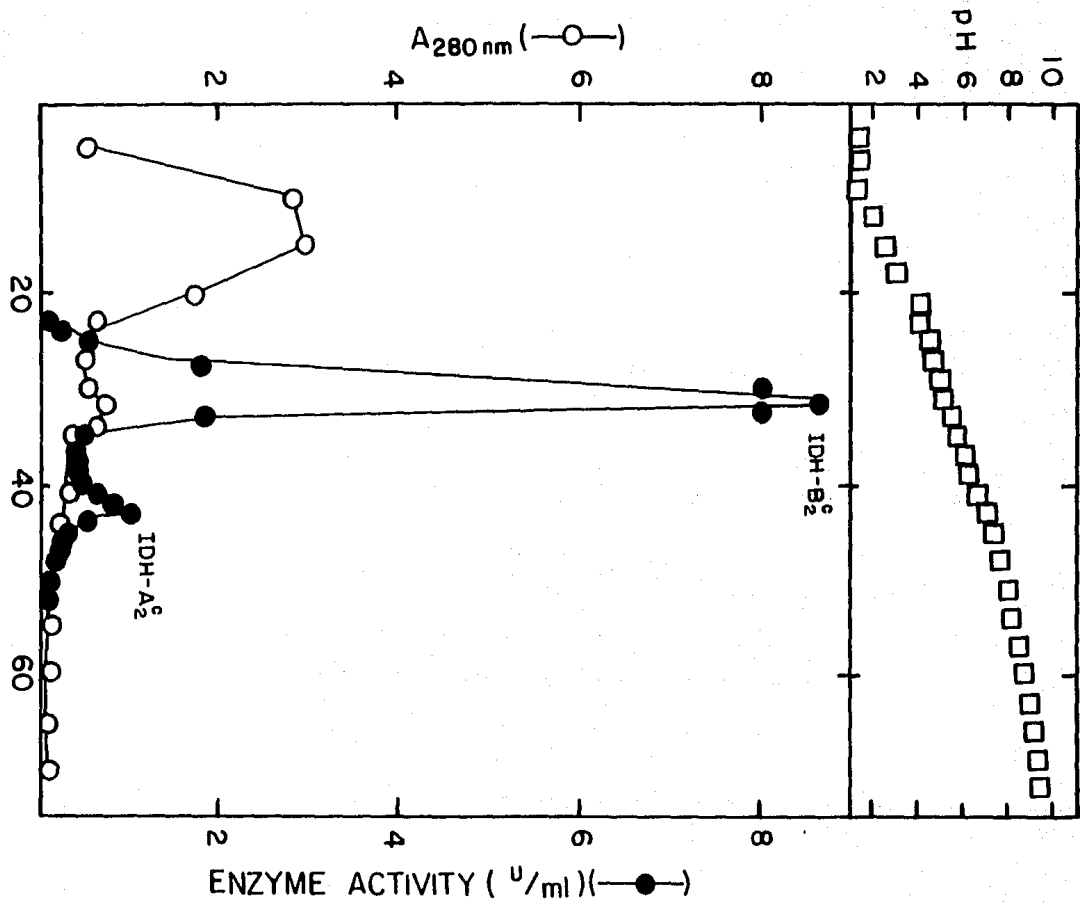


FIGURA 2.13B. Perfil de elución de una columna de isoelectroenfoco corrida con un extracto conteniendo a la isozima IDH-C₂. En la parte superior del perfil se muestra el gradiente de pH. El punto isoeléctrico (pI) fue: 5.29. Resolución: 32 horas a 600 volts a 4°C. Actividad de IDH (●); A₂₈₀ nm (○); pH (□)

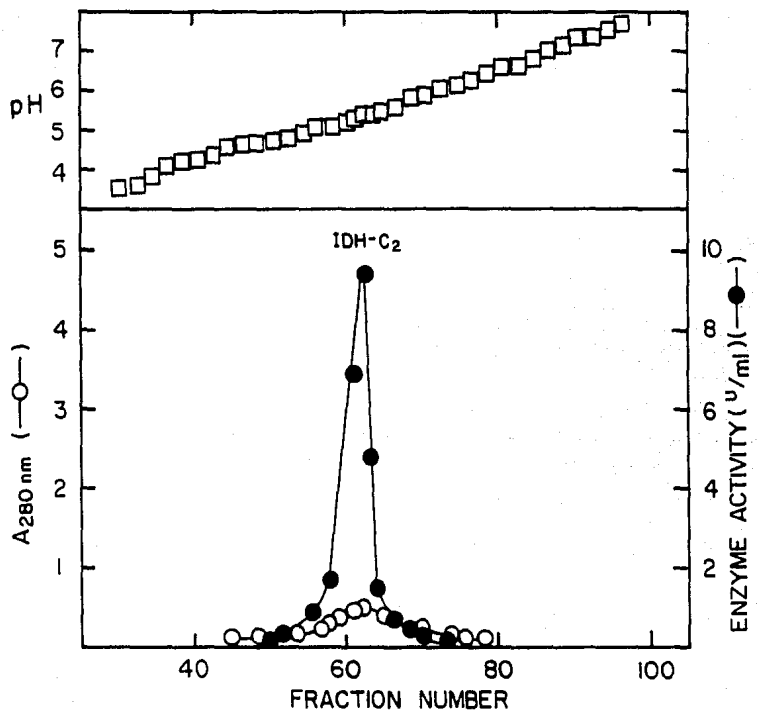


FIGURA 2.14 Registros densitométricos y fotografías de dos geles de poliacrilamida-SDS al 10% para las isozimas IDH-B₂ y IDH-A₂ de Fundulus heteroclitus. Las muestras de enzima pura se obtuvieron de la columna de isoelectroenfoque mostrado en la Fig.2.13A. Las flechas indican la posición del colorante indicador (Pironin-Y). Los geles se corrieron de izquierda a derecha.

A) 15 ug de IDH-B₂

B) 10 ug de IDH-A₂

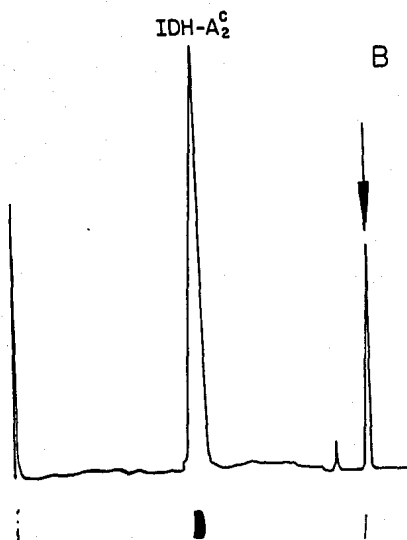
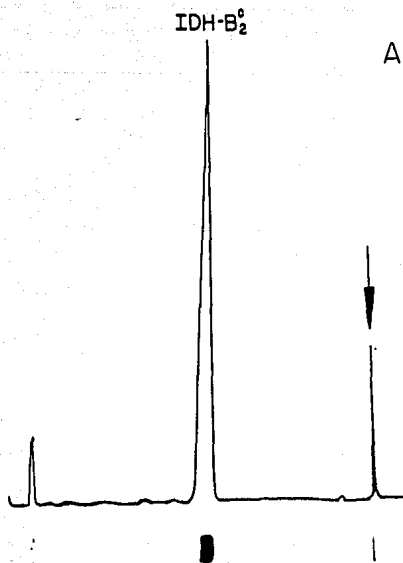


TABLA 2.6 PUNTOS ISOELECTRICOS PARA LA DESHIDROGENASA ISO-CITRICA ESPECIFICA DE NADP DE VARIAS FUENTES.

FUENTE	pI	REFERENCIA
CORAZON DE RES	7.4	Siebert <u>et al</u> , 1957b.
CORAZON DE	7.4	Plaut, 1962.
PUERCO	< 9.0	Colman, 1968.
<u>Azotobacter vinelandii</u>	6.1	Barrera & Jurtshuk, 1970.
HIGADO-PUERCO	6.5	Illingworth & Tipton, 1970.
TRUCHA ARCOIRIS	5.75	Moon & Hochachka, 1971a.
3 isozimas	5.72 6.90	
<u>Salmonella typhimurium</u>	4.0-4.2	Marr & Weber, 1973.
<u>E. coli</u>	5.0	Burke <u>et al</u> , 1974.
CORAZON HUMANO	7.0	Seelig & Colman, 1977.
CORAZON DE RATON	7.0	Pegoraro <u>et al</u> , 1979.
RINON DE RATON	4.8	" "
<u>Mytilus edulis</u>	5.5	Head, 1980.
2 isozimas	5.2	" "
<u>E. coli</u>	4.65	Vazques & Reeves, 1981.
2 isozimas	4.70	" " "
<u>Fundulus h.</u>		
HIGADO-MITOCH.	7.0	Esta tesis
HIGADO-CYTO.	5.19	"
MUSCULO BLANCO	5.29	"

FIGURA 2.15 Perfiles de inactivación por temperatura para las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de Fundulus heteroclitus. Las condiciones de los experimentos son descritas en la sección de Métodos.

IDH-B₂ (○)

IDH-A₂ (◐)

IDH-C₂ (●)

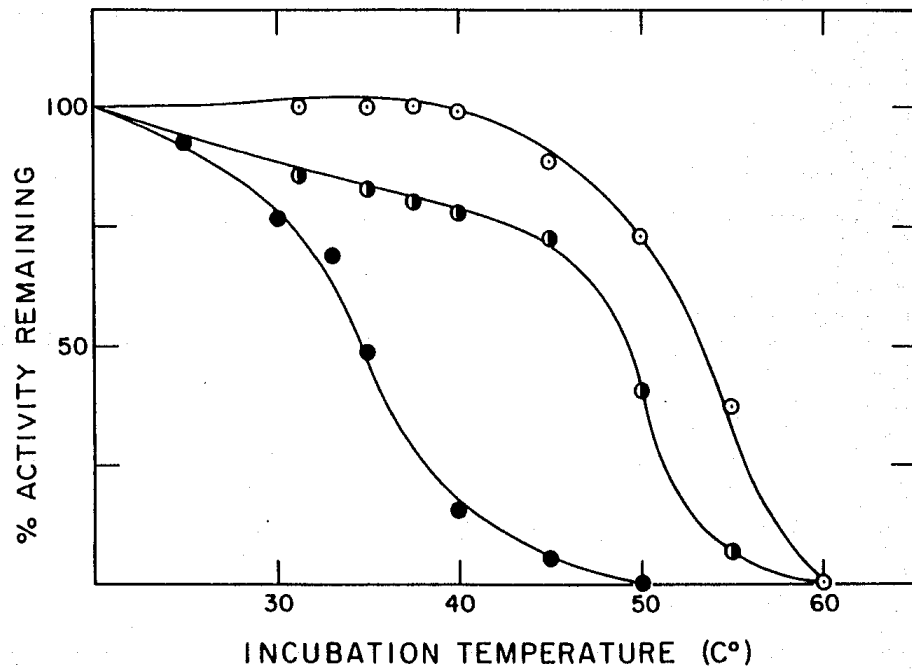


FIGURA 2.16 Perfiles de inactivación por temperatura de las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas de Fundulus heteroclitus en presencia de isocitrato. Las condiciones experimentales se describen en la sección de Métodos.

IDH-B₂ (○)

IDH-A₂ (◐)

IDH-C₂ (●)

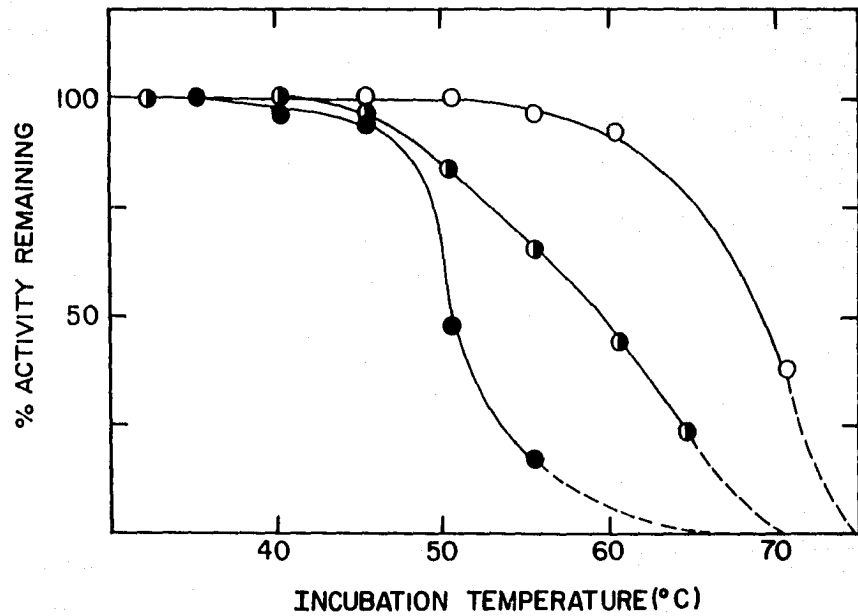


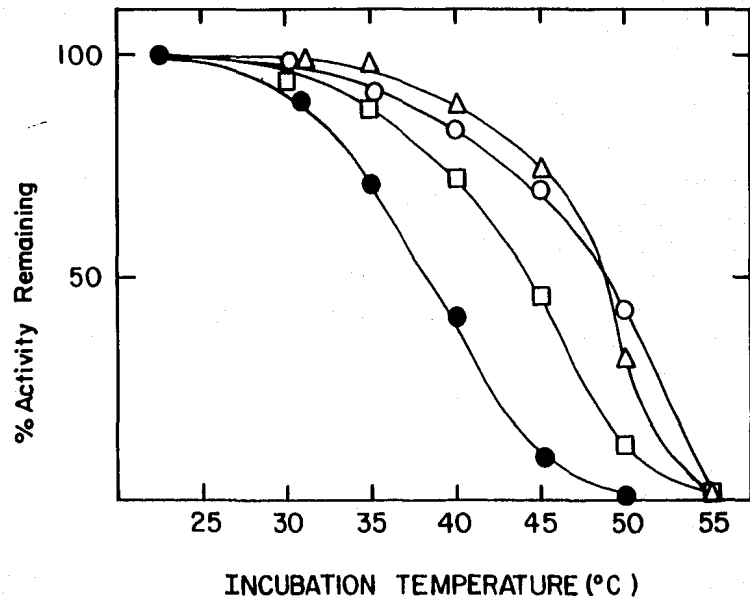
FIGURA 2.17 Perfiles de inactivación por temperatura para la isozima deshidrogenasa isocítrica NADP específica del músculo (IDH-C₂) de Fundulus heteroclitus con y sin sustratos. Las condiciones experimentales se describen en la sección de Métodos.

(●) Sin sustratos

(□) En presencia de MnSO₄ 2 mM

(○) En presencia de NADP 1 mM

(△) En presencia de DL-isocitrato 4 mM



enzima. Los resultados de estos estudios son mostrados en la Figura 2.15. Las tres isozimas IDH mostraron diferencias en termoestabilidad en el siguiente orden: IDH-B₂ > IDH-A₂ > IDH-C₂. La temperatura a la cual el 50% de la actividad de la enzima (T₅₀) permanece después de 20 minutos de incubación para las isozimas IDH de Fundulus heteroclitus fue: 54°, 49° y 35°C para IDH-B₂, IDH-A₂ y IDH-C₂ respectivamente. Por lo tanto, la forma más estable al calor fue la isozima citoplásmica del hígado, luego la forma mitocondrial; la isozima mitocondrial del músculo fue la más sensible al calor.

La estabilidad térmica relativa de cada isozima fue incrementada en gran medida cuando se incubaron en presencia de DL-isocitrato (9.5°C para IDH-A₂ y aproximadamente 15°C para IDH-B₂ y IDH-C₂). Ningún cambio en el orden de estabilidad térmica fue observado para las isozimas. La Figura 2.16 muestra los perfiles de inactivación al calor en presencia del sustrato. Los valores de T₅₀ en presencia de DL isocitrato fueron: 68.5°, 58.5° y 50°C para IDH-B₂, IDH-A₂ y IDH-C₂ respectivamente.

El efecto del metal (Mn²⁺) y el cofactor (NADP) sobre la inactivación al calor de la isozima muscular (IDH-C₂) fue también investigado. La Figura 2.17 ilustra los resultados. El efecto protector del DL isocitrato y del NADP es aproximadamente el mismo, y es mayor que el efecto

protector dado por el manganeso, el cual también incrementa la estabilidad de la proteína.

b. Cinética de la inactivación térmica.

Los resultados obtenidos de la incubación de las isozimas IDH a temperatura constante pero variando el curso del tiempo, son mostrados en la Figura 2.18. Estos resultados revelaron que el proceso de desnaturalización para las tres isozimas no sigue una cinética simple de primer orden.

La isozima muscular (IDH-C₂) fue incubada a las siguientes temperaturas constantes: 37°, 40°, 43°, y 45°C (Figura 2.19) con alíquotas siendo ensayadas en el curso del tiempo. Los resultados nuevamente revelaron que la enzima no sigue un proceso cinético simple de primer orden. El efecto del DL isocitrato y del NADP sobre la cinética de la desnaturalización térmica de la isozima muscular (IDH-C₂) a 45°C fue también investigado (Figura 2.20). El efecto protector contra la inactivación fue mayor para el sustrato que para la coenzima. Sin protectores, solamente el 11.5% de la actividad de IDH permanece después de 10 minutos de incubación a 45°C. En cambio en presencia de sustrato (DL-isocitrato 4 mM), el 61% de la actividad se conserva. En presencia de la coenzima (NADP 1 mM) el 24% de la actividad se conserva después de una hora de incubación. La presencia del cofactor o sustrato no afecta la cinética de la reacción, pues de nuevo mostró un proceso no-lineal simple de primer orden (non-linear first order process).

FIGURA 2.18 Cinética de la desnaturalización térmica para las isozimas deshidrogenasa isocitrica NADP específicas de Fundulus heteroclitus. Buffer: trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4 conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 1% (w/v).

IDH-B₂ (○)

IDH-A₂ (●)

IDH-C₂ (●)

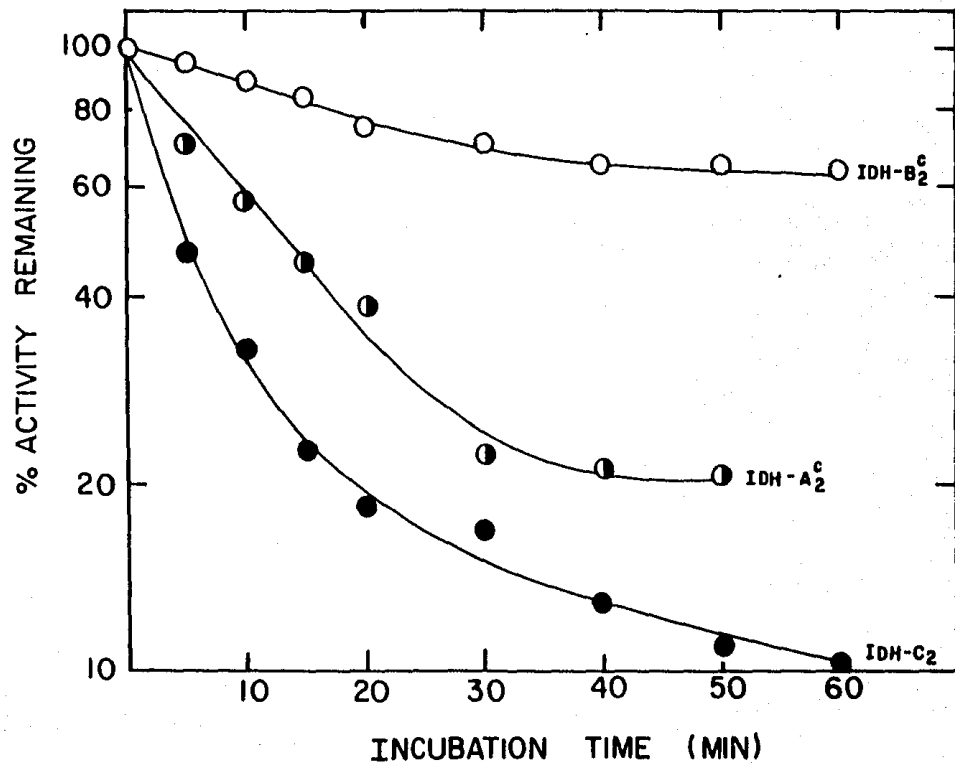


FIGURA 2.19 Cinética de desnaturalización térmica para la isozima deshidrogenasa isocítrica NADP específica del músculo (IDH-C₂) de Fundulus heteroclitus a diferentes temperaturas de incubación. Buffer: trietanol amina/Cl⁻ 30 mM pH 7.4 conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 1% (w/v).

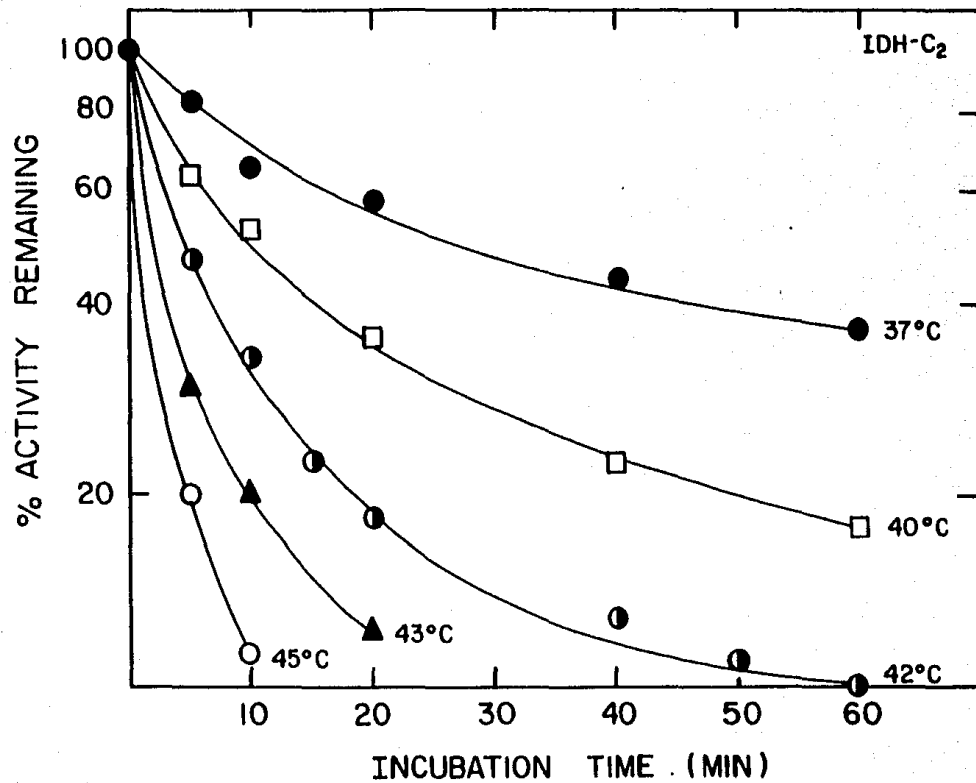
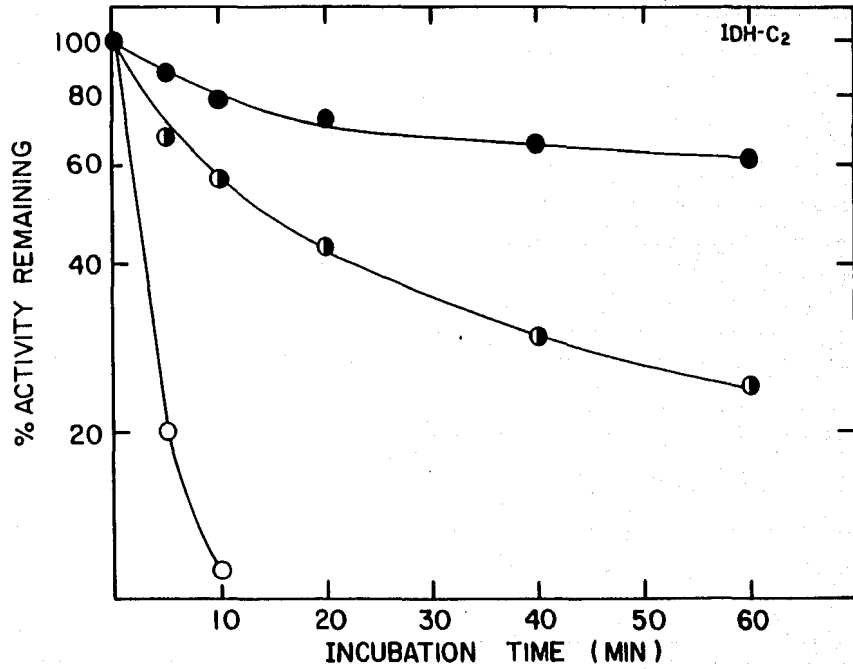


FIGURA 2.20 Cinética de la desnaturalización térmica de la isozima del músculo (IDH-C₂) de Fundulus heteroclitus en presencia de sustratos. Buffer: trietanol amina/Cl⁻ 30 mM pH 7.4 conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 1% (w/v).

(○) Sin sustratos

(●) Con DL-isocitrato 4 mM

(◐) Con NADP 1 mM



D. DISCUSION

1. Distribución en tejidos:

La presencia de isozimas IDH citoplásmica y mitocondrial específicas en los diferentes tejidos de Fundulus heteroclitus cae dentro del patrón de distribución general y localización celular observado en otros organismos. Sin embargo, el número de loci de cada isozima en diferentes fracciones celulares varía ampliamente entre las especies, y los patrones electroforéticos son muy variados.

En el salmón (Kijima y Fujio, 1977) la isozima citoplásmica específica de hígado tiene dos loci; un locus es polimórfico y el otro monomórfico. La forma mitocondrial específica de músculo, también tiene dos loci, un monomórfico y un polimórfico. En Fundulus heteroclitus la forma citoplásmica específica de hígado, tiene un locus (Idh-B) que es altamente polimórfico. La forma mitocondrial tiene dos diferentes loci: uno en músculo (Idh-C) que es monomórfico y uno en hígado (Idh-A) que es polimórfico. El salmon del Atlántico Salmo salar (Cross and Payne, 1977) tiene dos loci localizados en el citoplasma del hígado, un polimórfico y un monomórfico. Un tercer locus específico de la mitocondria del corazón es monomórfico. En una amplia variedad de peces, una forma de la IDH mitocondrial es específica para el tejido del corazón y la IDH citoplásmica es específica para el tejido del hígado, como en Fundulus heteroclitus.

2. Deshidrogenasa isocítrica NAD específica:

La presencia de dos diferentes enzimas (NADP-IDH y NAD-IDH) catalizando la misma reacción hace difícil la interpretación de los datos experimentales. La actividad extremadamente baja de la deshidrogenasa isocítrica NAD específica en los tejidos de vertebrados junto con la presencia de dos isozimas NADP-IDH, complica aun más la explicación de sus posibles papeles metabólicos. Pette (1966) mostró que la proporción de NAD-IDH y NADP-IDH varía de tejido a tejido, las variaciones de NADP-IDH sobrepasan aquéllas de NAD-IDH. Tucker (1968) observó que la tasa del ciclo del ácido tricarbóxico es varias veces mayor que la actividad de NAD-IDH (basado en la incorporación de oxígeno durante el vuelo) en el pichón. Crabtree y Newsholme (1970) midieron las actividades de ambas NAD-IDH y NADP-IDH en los músculos de perro, trucha, pichón, conejo y rata. Ellos encontraron que la actividad de NAD-IDH es extremadamente baja en algunos de los tejidos en comparación con la NADP-IDH y sugieren que la NAD-IDH de vertebrados es inestable. Una situación inversa fue encontrada en todos los músculos de insectos; las actividades de NAD-IDH exceden aquéllas de la enzima NADP-IDH, generalmente en más de diez veces.

En el hígado de la trucha arcoiris la enzima NAD-IDH no pudo ser detectada por Moon and Hochachka (1971a). Ellos indican que la enzima no existe en los tejidos del pez, o que

es altamente inestable. Sin embargo, en el músculo de la trucha Salmo gairdneri y en el músculo y corazón del pez Scylliorhinus canicula, Newsholme y Start (1973) sí detectaron la enzima NAD-IDH. La actividad de NAD-IDH y NADP-IDH ha sido también detectada en los músculos de una gran variedad de animales (Alp et al, 1976). La actividad de NAD-IDH se encontró que existe en todos los phylum examinados (coelenterata, annélida, molusca arthrópoda, insecta, pisces, amphibia, aves y mammalia). Sin embargo, en un cierto número de músculos de ambos vertebrados e invertebrados la actividad de la enzima NAD-IDH fue muy baja. En estudios sobre la regulación de la actividad de NAD-IDH por el calcio, Mc Cormack y Denton (1981) también mostraron la existencia de esta enzima en trucha, pichón, rana, y corazón humano. En el teleosteo Fundulus heteroclitus (esta tesis), se detectó la presencia de la actividad de NAD-IDH en todos los tejidos estudiados. Ya que estos resultados concuerdan con los de Newsholme y Start (1973), Alp et al (1976), y Mc Cormack y Denton (1981), concluimos que la NAD-IDH existe en los tejidos del pez.

Por otro lado, ha sido demostrado que la NAD-IDH es activada y estabilizada con ADP y glutatión (Chen y Plaut, 1963), con ADP (Goebell y Klingenberg, 1964; Mc Cormack y Denton, 1981), con glicerol (Cox y Davies, 1967), o con ambos ADP y glicerol (Alp et al, 1976). En este estudio, el sistema

buffer usado para preparar los extractos de tejido fue complementado con glicerol y ADP. Los extractos fueron inmediatamente ensayados y la actividad de NAD-IDH registrada. Después de varias horas, se volvieron a ensayar los extractos de tejido, pero la actividad de NAD-IDH fue detectada en menor cantidad en algunos tejidos o estuvo ausente. Esto muestra la inestabilidad de la enzima NAD-IDH y el porqué fallamos en detectarla en los geles de almidón después de 20 horas de electroforesis, aun en presencia de glicerol y ADP. Se ha argumentado que la determinación del nivel de la enzima NAD-IDH de extractos de tejido en presencia de ADP puede presentar ciertos problemas (Plaut, 1969). Tales preparaciones pueden contener cinasa adenilato (Chiga y Plaut, 1960) que induce la formación de ATP de ADP, el cual a su vez puede fosforilar NAD a NADP en presencia de cinasa DPN. Una subsecuente reducción de NADP por citrato, en presencia de la enzima NADP-IDH, puede ocurrir (Vignais y Vignais, 1961). Esta interferencia es difícil de eliminar en tejidos como hígado. Además, ha sido demostrado que la cinasa adenilato de la mitocondria del hígado puede generar ATP del ADP en presencia del metal divalente Mg^{2+} (Klingenberg y Pfaff, 1966). No podemos descartar la posibilidad de que parte de la actividad de NAD-IDH detectada en los tejidos de Fundulus heteroclitus fue inducida por estos efectos, pues el buffer de reacción contenía ambos ADP y el ión metálico divalente

manganeso, y en las células está presente la cinasa adenilato. Este punto será clarificado en estudios futuros. Plaut y Aogaichi (1967) pudieron separar completamente ambas NAD-IDH y NADP-IDH de la mitocondria del hígado de rata, ellos encontraron que la NAD-IDH existe en la mitocondria y es una molécula mucho mas grande que la NADP-IDH.

La presencia de la NAD-IDH y dos formas NADP-IDH en los tejidos del pez puede ser importante fisiológicamente y del punto de vista evolutivo. Algunos de estos aspectos serán discutidos en el capítulo tres de esta tesis.

3. Purificación de las isozimas del hígado y músculo:

a. Problemas de Purificación.

Los principales problemas encontrados en la purificación de las isozimas IDH fueron la cantidad de material y la inestabilidad de las isozimas; esta última siendo extrema en la isozima mitocondrial del hígado (IDH-A₂). Los hígados de peces adultos pesan en promedio de 0.1 a 0.2g; así, 50 gramos de hígados representan el sacrificio de aproximadamente 300 a 500 peces y la captura de por lo menos mil individuos para obtener material suficiente para varias preparaciones. El tejido muscular fue abundante.

Las condiciones dadas en el procedimiento de purificación fueron logradas despues de probar diferentes sistemas buffer donde las isozimas de F. heteroclitus no fueran lábiles. Varios métodos usados para estabilizar la en-

zima NADP-IDH de varias fuentes animales han sido reportados. La adición de agentes quelantes y búfferes de alta fuerza iónica ayudan a estabilizar preparaciones enzimáticas (Plaut, 1962; Siebert et al, 1957b). El complejo manganeso-citrato en buffer tris, estabiliza la enzima durante su purificación (Londesborough and Dalziel, 1970), y el uso de búfferes con alta fuerza iónica, pH neutro, y el ión manganeso, constituye un requerimiento en la estabilización de la enzima (Seelig y Colman, 1977). Glicerol ha sido también usado para estabilizar la actividad de enzimas, así como la estructura nativa de proteínas (Jarabak et al, 1966; Ruwart y Suelter, 1971; Bradburg y Jakoby, 1972), y mostró ser un buen estabilizador de la enzima IDH (Reeves et al, 1972; Farrell, 1980; Vazques y Reeves, 1981). Además, los mecanismos por los cuales el glicerol estabiliza a las proteínas han sido estudiados (Gekko y Timasheff, 1981).

En nuestro sistema IDH, el glicerol mostró ser altamente eficiente como estabilizador. En adición, la presencia del ión manganeso en todos los sistemas buffer fue crítico para la recuperación de la enzima. Por lo tanto, manganeso y glicerol fueron siempre usados en los sistemas buffer. Otros estudios sobre la estabilidad de la enzima han mostrado que iones tetrahédricos como sulfatos y fosfatos protegen algunas enzimas contra inactivación (Rippa et al, 1981a y b). Es interesante hacer notar que algunos de los

sistemas buffer usados en estos estudios contenían sulfato de sodio. Probablemente, el ión sulfato o el efecto combinado de éste con los constituyentes del buffer son también responsables de la estabilización de la enzima.

Problemas de inestabilidad fueron también encontrados durante electroforesis en condiciones de no desnaturalización. La adición de glicerol a la mezcla del gel y al buffer electrodo, resultó en una buena resolución de las tres isozimas.

b. Recuperación de la isozima mitocondrial (IDH-A₂).

La isozima IDH-A₂ fue la forma más difícil de purificar debido a su marcada inestabilidad aun en presencia de estabilizadores como glicerol, manganeso o iones sulfato en el buffer tris/citrato. Debido a su alta inestabilidad y baja recuperación, se intentó separarla de la forma citoplásmica en tres formas diferentes: por aislamiento mitocondrial, por cromatografía de intercambio iónico y por isoelectroenfoque.

El aislamiento mitocondrial resultó en una excelente separación de la forma citoplásmica; sin embargo, este procedimiento requiere de hígados frescos para aislar las mitocondrias intactas. Esto no fue posible porque requería de traer peces vivos del área de colecta al laboratorio. Su separación en celulosa CM-52 dio buenos resultados, pero el rendimiento fue bajo ya que el extracto conteniendo la

isozima debe ser pre-purificado antes de separar IDH-A₂ de IDH-B₂. Finalmente el método de isoelectroenfoque, el cual requiere también de extractos pre-purificados, resolvió a las isozimas en dos picos perfectamente separados. Sin embargo, el rendimiento fue aún más bajo porque este procedimiento toma más tiempo. Ya que el mejor rendimiento fue logrado por cromatografía de intercambio iónico sobre celulosa CM-52, este método fue escogido para separar a la isozima IDH-A₂ de la isozima IDH-B₂.

c. Cromatografía de afinidad.

Cibacrón azul F3GA es ampliamente usado como un medio de cromatografía de afinidad en estudios con deshidrogenasas debido a la similitud estructural entre su cromóforo azul y los cofactores nucleótido. Wilson (1976) sugiere que todas las enzimas que tienen sitios de enlace para nucleótidos pueden interactuar con el colorante azul. En adición, Anderson y Reynolds (1965) han sugerido fuertes interacciones hidrofóbicas en las deshidrogenasas, debido al carácter hidrofóbico del Cibacrón azul F3GA.

El Affi-gel azul ha sido considerado como un medio de cromatografía de afinidad debido a que el enlace es tan específico, que las deshidrogenasas pueden ser eluidas con sustratos o efectores de estas enzimas (Bio Rad, 1977). Sin embargo, existen varias indicaciones de que este gel puede no cumplir con la definición estricta de cromatografía de

afinidad. La elución de NADP-IDH de corazón humano puede ser lograda con NADP, ATP, NMN, e incluso glicerol, debido a fuertes interacciones hidrofóbicas (Seelig y Colman, 1977). Thang et al (1979) mostró que los iones divalentes también afectan el enlace de una proteína a el gel azul. Debido a que el gel azul puede exhibir ambas interacciones específicas y no específicas, debe tenerse cuidado al usarlo como un diagnóstico indicador del "grupo dinucleotido" (Seelig y Colman, 1979) de las dehidrogenasas, como lo han sugerido Stellwagen et al (1975).

La presencia o ausencia de iones metálicos divalentes como Mg^{2+} , afecta la adsorción y elución de sintetasas al gel azul (Thang et al, 1979). Se ha explicado que nucleotidos enlazados en la enzima incrementan la carga de la proteína, disociándola más fácilmente del ligando en ausencia de Mg^{2+} . La presencia de Mg^{2+} , por el contrario, neutraliza la carga del nucleotido y los grupos iónicos del gel, incrementando la interacción de la enzima con su ligando.

En estos estudios, la adsorción y elución de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica de Fundulus heteroclitus al Affi-gel azul, fue afectado por pH, interacciones salinas y el ion metálico Mn^{2+} . A pH 7.4 la elución de la isozima citoplásmica del hígado (IDH-B₂) fue fácilmente lograda con NADP en presencia de Mn^{2+} , mientras

que la elución de IDH-A₂ y IDH-C₂ no fue lograda. Entonces estas isozimas mostraron una fuerte interacción con el gel en presencia de manganeso. Cuando el pH fue elevado a 8.0, la elución de ambas isozimas fue factible. En ausencia de manganeso se obtuvieron bajos rendimientos, y en su presencia estos fueron altos. Un incremento en pH durante la elución de IDH-B₂ no mejoró ni afectó la recuperación de la enzima, entonces se escogió pH 8.0 cuando la cromatografía de afinidad en Affi-gel azul fue usada para la purificación de las tres isozimas IDH. Manganeso y pH 8.0 disminuyen la interacción de la enzima con su ligando, facilitando su elución con la coenzima. La ausencia de manganeso incrementa la interacción de la enzima con su ligando, haciendo difícil su elución del gel azul.

Incrementando la concentración del buffer en aproximadamente seis veces resultó en la elución de IDH-C₂, junto con otras proteínas contaminantes. IDH-B₂ y IDH-A₂ no pudieron ser eluidas a esta concentración del buffer. Las tres isozimas fueron también eluidas del gel azul con un gradiente de sal. El rendimiento es casi 100% pero la actividad específica es baja. La elución de las isozimas con NADP da rendimientos de aproximadamente 50%, pero la actividad específica es alta. Por lo tanto, el rendimiento de las isozimas fue sacrificado por una mejor pureza. Esta conducta variable de las isozimas en cromatografía de afinidad

sugiere que débiles y/o fuertes interacciones gel-isozima dependen del pH, manganeso, concentración del buffer y carga neta de las isozimas. La elución "pseudo-específica" con NADP puede ser debido a un cambio en la carga total de las isozimas IDH siguiendo la adsorción del cofactor. Esto puede también reflejar la identidad propia de cada isozima con respecto a propiedades estructurales. Los altos rendimientos obtenidos después de cromatografía de afinidad en presencia de manganeso indican que el metal ayuda a estabilizar el sitio activo de las isozimas durante su adsorción y elución del gel, pues el Mn^{2+} mostro ser un buen protector de las isozimas IDH contra desnaturalización.

Varios intentos de adsorber deshidrogenasas a columnas de afinidad conteniendo enlaces coenzima han sido hechos (Mosbach, 1976). La NADP-IDH de E. coli ha sido purificada en gran medida por cromatografía de afinidad en agarosa-hexano-NADP a través de la posición 6-amino (Hy y Reeves, 1976). Sin embargo, la adsorción de las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus en diferentes geles de agarosa-NADP no pudo ser lograda.

4. Isoelectroenfoque:

Los resultados de isoelectroenfoque revelaron casi el mismo pI (iso-pH) para las isozimas citoplásmica de hígado (IDH-B₂) y muscular mitocondrial (IDH-C₂). Esto fue esperado porque migran casi en la misma posición después de

electroforesis en gel de almidón. La isozima mitocondrial de hígado (IDH-A₂) mostro un pI neutro. Fisher et al (1977) afirman que la mayoría de las isozimas mitocondriales de humano tienden a ser básicas y que la distribución de las cargas superficiales de la isozima mitocondrial puede ser un factor que determina su localización subcelular (pegoraro y Lee, 1979). En F. heteroclitus esto no fue el caso, pues la isozima mitocondrial del músculo es acídica y la del hígado es neutra.

Durante el isoelectroenfoque de la isozima IDH-B₂, se encontraron a veces dos picos de actividad enzimática. Esta conducta anómala se cree que es debido a un cambio en la composición de los amino ácidos de las proteínas, dando múltiples picos de actividad (Jacobs, 1973) o a un artefacto generado por los anfolitos (Illingworth, 1972). En estudios con hemoglobinas (Drysdale et al, 1971) los valores de los puntos isoeléctricos van de acuerdo con las substituciones de amino ácidos conocidas; además las transiciones de los amino ácidos (cambio de carga) concuerdan bien con cambios en el pI.

Las bases amina y ácidos carboxílicos de las proteínas también pueden comportarse anómalamente, dependiendo del micromedioambiente que las rodea, como consecuencia, el pK puede ser altamente perturbado (Fersht, 1977). Por ejemplo, un ión carboxilato puede formar un puente de sal con

un ión amonio, ser estabilizado por la carga positiva y llegar a ser más ácido. De esta manera, diferencias en el pI pueden surgir de un solo cambio en la carga de un amino ácido. Estudios sobre la composición de amino ácidos en las isozimas IDH del ratón revelaron diferencias significativas en la composición de éstos y en los puntos isoeléctricos (pI) (Pegoraro et al, 1979). Fisher et al (1977) afirman que las diferencias en los valores de pI entre isozimas están relacionados con diferentes amino ácidos cargados, aunque no es posible determinar el número actual de ellos, pues no hay asociación entre los pI y la existencia de un polimorfismo electroforéticamente demostrable. Ellos también sugieren una posible asociación entre puntos isoeléctricos y función. Al pH fisiológico (7.4) la mayoría de las proteínas están cargadas, porque muy pocas tienen un pI en este rango. No se sabe si esto es un resultado aleatorio o una consecuencia de la selección natural (Fisher et al, 1977). Así, aún tiene que resolverse si las diferencias en los valores de pI entre las isozimas NADP-IDH puede ser relacionado con propiedades estructurales y funcionales.

5. Estudios de estabilidad térmica:

Estos estudios revelaron que la estabilidad térmica de las isozimas NADP-IDH es significativamente diferente. La isozima citoplásmica del hígado fue la forma más estable.

Esta forma (IDH-B₂) mostró un patrón de inactivación lento en 20 minutos a 45°C y una desnaturalización rápida después de 50°C. La isozima IDH-A₂ mostró desnaturalización rápida después de 45°C. La isozima IDH-C₂ mostró la más baja termoestabilidad, siendo la inactivación por calor marcadamente rápida después de 30°C y completada en 20 minutos a 50°C. Cuando las isozimas fueron incubadas en presencia del sustrato isocitrato, la estabilidad térmica relativa fue incrementada en gran medida. Este efecto protector del sustrato fue diferente entre las isozimas. Una protección total contra el calentamiento a 55°C durante 20 minutos fue observada para la isozima IDH-B₂, mientras que las isozimas IDH-A₂ y IDH-C₂ mostraron baja termoestabilidad y la protección fue sólo efectiva a 40°C por 20 minutos. Después de este tiempo, se empezaron a desnaturalizar rápidamente. La desnaturalización fue completada en 20 minutos a aproximadamente 70°C y 60°C para IDH-A₂ y IDH-C₂ respectivamente. Esto indica que el isocitrato juega un papel importante en mantener la estabilidad térmica de las isozimas. La presencia de NADP y Mn²⁺ también protege a las isozimas. La presencia de NADP y Mn²⁺ también protege a la isozima IDH-C₂ contra desnaturalización por calentamiento. El cofactor protege a la isozima casi al mismo nivel del sustrato, mientras que en presencia de manganeso la protección es menor.

En estudios de cinética de desnaturalización térmica, la pérdida de actividad enzimática es frecuentemente descrita como un proceso cinético de primer orden (Sudi, 1970). Sin embargo, las isozimas NADP-IDH mostraron una cinética no-lineal de primer orden, tanto en ausencia como en presencia de sustrato y coenzima. Pegoraro y Lee (1979) mostraron que las isozimas NADP-IDH del ratón exhiben diferencias significativas en desnaturalización térmica. Isocitrato y NADP protegieron a la isozima citoplásmica casi a un nivel similar, mientras que la isozima mitocondrial en las mismas condiciones no fue protegida. Sus perfiles de estabilidad térmica no mostraron cinética de primer orden. Se han sugerido diferencias en la estructura y el modo de interacciones enzima-ligando entre estas dos isozimas de diferencias encontradas en el modo de protección dado por el sustrato y la coenzima (Illingworth y Tipton, 1970).

Estudios sobre la estabilidad térmica de las isozimas NADP-IDH del ratón a varios pH (Pegoraro y Lee, 1979) también mostraron diferencias significativas, indicando que una variación en la carga superficial de las isozimas puede afectar su estabilidad estructural. Estudios similares en las isozimas NADP-IDH de Bacillus stearothermophilus (Nagaoka et al, 1977) pero en presencia de magnesio e isocitrato, una forma modificada de la enzima exhibe más baja termoestabilidad que la forma nativa. Isocitrato y Mg^{2+}

fueron protectores efectivos, pero en su ausencia o con NADP, una rápida inactivación fue notada. Los perfiles de inactivación térmica no exhibieron procesos cinéticos de primer orden. El efecto de la temperatura observado sobre la estabilidad de la enzima NADP-IDH del hígado de res (Carrier y Pantaloni, 1973) mostró que hay una protección total de la está en presencia del complejo manganeso-isocitrato, o un análogo, manganeso-citrato, a altas concentraciones. Los perfiles de inactivación térmica no exhibieron cinética de primer orden.

Basados en tales estudios y nuestros resultados, se sugiere que las isozimas IDH-NADP de Fundulus heteroclitus exhiben marcadas diferencias estructurales sobre las bases de estabilidad térmica. La falta de linealidad observada durante el curso de tiempo de la desnaturalización térmica de las isozimas NADP-IDH, hace difícil la explicación del proceso cinético. En estudios con deshidrogenasa láctica de F. heteroclitus, solamente el heterotetrámero B^AB^b, exhibió un proceso cinético de inactivación térmica no-lineal (Place, 1979). Estudios con deshidrogenasa malato en el mismo pez, mostraron que todas las isozimas (homodímeros) exhiben un proceso cinético de desnaturalización térmica no-lineal. Esto es similar a la conducta exhibida por las isozimas IDH-NADP (homodimeros) de F. heteroclitus y otras fuentes animales como se describió anteriormente.

En los estudios de deshidrogenasa láctica (LDH), la falta de linealidad se explica, suponiendo que los dos tipos de subunidades B^a y B^b se desnaturalizan independientemente, cada una con una diferente tasa constante de desnaturalización. La relación: Actividad Fraccional = $C_b e^{k_b t} + C_a e^{k_a t}$ fue aplicada para obtener las tasas curvilíneas de desnaturalización térmica (Place, 1979). En los estudios con deshidrogenasa malato (MDH), la misma relación fue usada, pero la falta de linealidad se explicó bajo diferente supuesto, basado en la naturaleza de las constantes C_1 y C_2 . Dos mecanismos son descritos: Uno implica un intermediario activo en el proceso de desnaturalización (disociación del dímero en monómeros activos), que se vuelve inactivo en una fase secundaria más lenta; el segundo implica una mezcla de formas con diferentes tasas constantes de desnaturalización (Cashon, 1981). Ninguna de estas explicaciones puede ser aplicada a la conducta de las isozimas IDH-NADP, ya que la forma dimérica de IDH tiene subunidades equivalentes, no se observaron monómeros activos en los diferentes procedimientos de electroforesis y filtración el gel, y no existió una mezcla de isozimas en los extractos purificados.

Se ha también observado, por medio de análisis cristalográfico, que los iones PO_4 se enlazan simultáneamente a dos residuos de amino ácidos conectándolos entre sí.

La formación de estos "puentes fosfato" pueden estabilizar conformaciones proteicas, haciéndolas más resistentes a inactivación (Rippa et al, 1981a). Las sales inorgánicas como NaCl también estabilizan enzimas con respecto a desnaturación térmica (Balamir and Emerk, 1982). Estos hechos pueden también explicar la falta de linealidad observada en los estudios de las isozimas MDH. El buffer fosfato y NaCl usados en estos estudios pudieron posiblemente inducir un efecto protector. En los estudios de desnaturalización térmica de las isozimas NADP-IDH, esta explicación no es suficiente, porque se usaron diferentes sistemas buffer y no se agregaron sales.

Una posible explicación es que un cambio estructural pudo tener lugar en la enzima, alterando la conformación del sitio activo y cambiando los requerimientos energéticos del proceso catalítico (Roberts, 1977). Por lo tanto, la existencia de dos estadios conformacionales de la proteína dependientes del tiempo, ocurriendo a diferentes tasas y temperaturas para cada isozima, puede ser factible. Los estadios pueden incluir alteraciones localizadas o una reorganización extensiva. Entonces la expresión matemática usada en los estudios de LDH para el heterotetramero (Place, 1979), fue también aplicada para ajustar nuestros datos, suponiendo que cada estado conformacional sigue un proceso cinético de primer orden, y que el proceso de desnaturalización general

puede ser analizado como la suma de dos tasas de reacción de primer orden (ver APENDICE IA). Sin embargo, no se insinúa que las diferentes tasas de cambio pertenecen a una sola clase de transiciones durante el proceso de desnaturalización proteica. Todos los estudios presentados en este capítulo proporcionan evidencia de la heterogeneidad estructural de las isozimas IDH-NADP de F. heteroclitus.

En resumen, diferencias en la distribución de tejidos, localización subcelular, movilidades electroforéticas, puntos isoeleéctricos, modos de acción sobre cromatografía de afinidad, y desnaturalización térmica, fueron encontradas en las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus. Estas características proveen información acerca de diferencias estructurales y de diferencias en actividad y estabilidad. Ya que la temperatura es uno de los factores físicos más importantes que afecta la estructura y función de las enzimas, el significado fisiológico de las diferencias térmicas presentadas en este capítulo, junto con las propiedades cinéticas, discutidas en el siguiente, proveen una visión concerniente con la posible función fisiológica de estas isozimas NADP-IDH y su especificidad en los tejidos.

CAPITULO III

ISOZIMAS DESHIDROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICAS DE
Fundulus heteroclitus (L.): CINETICA ENZIMATICA.

A. INTRODUCCION

Es evidente que las isozimas IDH de Fundulus heteroclitus tienen características estructurales que las hacen únicas (Capítulo II). Sin embargo, las propiedades funcionales son desconocidas. Ya que ambas propiedades cinéticas y papeles metabólicos de las isozimas NADP-IDH son inciertos, sus propiedades funcionales fueron estudiadas. Fundulus heteroclitus se encuentra distribuido sobre un amplio rango geográfico a lo largo de un gradiente térmico agudo (Powers y Place, 1978), y está sujeto a fluctuaciones ambientales de temperatura (Nixon y Oviatt, 1973). Ya que su pH interno cambia con la temperatura (Rahn et al, 1975), la tasa de descarboxilación oxidativa de isocitrato fue estudiada para las isozimas multilocus NADP-IDH en relación a ambos temperatura y pH.

B. MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos Químicos:

Acido DL isocítrico (sal de trisodio, Tipo I), Ds (+) acido isocítrico (sal de monopotasio) Grado III, -nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADP; TPN; Tri-fosfopiridina nucleótido; Coenzima II) sal de monosodio, albúmina de suero de bovino (BSA), deshidrogenasa isocítrica

altamente purificada (corazón de puerco), y tris-hidroximetil amino metano (TRIS), fueron comprados de Sigma Chemical Co. Acido etileno diamina tetracético, sal de disodio (EDTA) e imidazole fueron de Matheson-Coleman y Bell (MCB). Trietanol amina, Sulfato de Manganeso ($MnSO_4 \cdot H_2O$), cloruro de potasio y acido clorhídrico fueron de Baker Reagents. Los demas reactivos químicos usados fueron grado analítico. Agua destilada y desionizada fue usada en todas las soluciones acuosas.

2. Cristalería:

Las pipetas y matraces volumétricos pequeños fueron dejados en ácido crómico durante la noche, enjuagados exhaustivamente con agua destilada y secados en el horno a $110^\circ C$. Las celdas para los ensayos enzimáticos fueron sumergidas en una solución de EDTA 1 mM y enjuagadas con agua destilada. El material de cristalería restante fue lavado con detergente Alconox y secado a $110^\circ C$. Las micropipetas fueron lavadas en ácido crómico y enjuagadas con agua destilada y desionizada por medio de un lavador de micropipetas (Adams-18 Place) conectado a una bomba de succión. Las pipetas se secaron con aire aspirado a través de ellas.

3. Datos Bioquímicos:

Los datos bioquímicos usados para la preparación de buffers, estandarización de sustratos y correcciones de fuerza iónica y pK en función de temperatura y pH son

mostrados en la Tabla 3.1 (Dawson et al, 1969).

4. Sistemas Buffer:

Los buffers de trabajo se prepararon bajo las condiciones en que ellos fueron usados. Y se escogieron con un pK_a tal que éste permitiera cualquier ΔpK_a que pudiera ocurrir debido a cambios de temperatura.

Buffer: Imidazole/ Cl^- 33 mM fue usado para los estudios cinéticos de pH 6.5 a 7.0 a 25°C.

Buffer: Trietanol amina/ Cl^- 30 mM (la concentración de este buffer es expresada en términos del anión) fue utilizado para estudios cinéticos de pH 7.4 a 8.0 a 25°C.

Buffer: Tris/ Cl^- 30 mM fue utilizado para estudios cinéticos de pH 8.5 a 9.0 a 25°C.

El pK_{a1} a 25°C de cada buffer fue usado para calcular la fuerza iónica (Segel, 1976). Se utilizaron un potenciómetro (Radiometer/Copenhagen pH Meter 26) para las mediciones de pH y dos Buffers standards (National Bureau of Standards) para la estandarización de pH.

5. Estandarización de Substrato y Coenzima:

NADP contiene agua y acetona que varían de acuerdo a las condiciones de almacenaje. Entonces, una calibración apropiada fue llevada a cabo para determinar un factor que pudiera ser utilizado en cálculos de rutina para corregir el peso molecular. El ácido isocítrico es una mezcla de dos isómeros: el DsLg Isocitrato (isómero activo), y el LsDg

TABLA 3.1 DATOS BIOQUIMICOS USADOS EN CALCULOS DE FUERZA IONICA Y ESTANDARIZACION DE SUSTRATOS PARA LA PREPARACION DE BUFFERS.

COMPUESTO	T° C	pK _{a1}
TRITANOLAMINA	10°	8.067
	15°	7.963
	20°	7.861
	25°	7.762
	30°	7.766
	35°	7.570
TRIS	25°	8.10
IMIDAZOL	25°	7.07
ACIDO ISOCITRICO	25°	pK _{a1} 3.29
		pK _{a2} 4.71
		pK _{a3} 6.40
NADP	25°	pK _{a1} 3.7
		pK _{a2} 6.1
COENZIMA	COEFICIENTE DE EXTINCION MOLAR	
NADP	E ^M _{259 nm} = 18,000	
NADPH	E ^M _{340 nm} = 6,200	

Isocitrato (isómero inactivo). El isómero activo contiene la configuración D en el anomero- α (Vickery, 1962) y constituye solamente el 49% del ácido DL isocítrico. Entonces, una calibración apropiada fue llevada a cabo y un factor de corrección calculado. La calibración de ambos sustrato y coenzima fue hecha cada vez que se abría un frasco nuevo de cada reactivo.

La concentración real de NADP se determinó tomando la absorbancia a 259 nm de soluciones diluidas de NADP. Este valor y la concentración calculada fueron utilizadas para determinar el factor de corrección. La concentración del ácido isocítrico fue determinada enzimáticamente siguiendo en un espectrofotómetro la estequiometría de la formación de NADPH a 340 nm. La reacción fue catalizada con NADP-IDH de corazón de puerco (Sigma) y la cantidad de enzima usada fue lo suficientemente alta para agotar el sustrato agregado. El factor de corrección para el isocitrato fue obtenido de la concentración calculada y la concentración real. Ambos factores de corrección para NADP e Isocitrato fueron utilizados en cálculos de rutina posteriores.

$$\underline{\text{NADP:}} \quad A_{259 \text{ nm}}/E_{259}^{1800} = [\text{NADP}]_{\text{real}}$$

$$[\text{NADP}]_{\text{real}}/[\text{NADP}]_{\text{calculado}} = \text{Factor de Corrección}$$

Acido Isocítrico:

$$\text{OD}_{340} = \text{OD}_{340} \text{ Final} - \text{OD}_{340} \text{ Inicial}$$

$$(\text{OD}_{340} \times \text{Vol del ensayo})/E \times d \times v [\text{isoc}]_{\text{real}}$$

$E_{340} = 6.2 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$, $d = 1 \text{ cm}$, $v = \mu\text{l}$, Vol del ensayo = 1ml

$[\text{isoc}]_{\text{real}}/[\text{DL-isoc}]_{\text{calculado}} = \text{Factor de Corrección}$

6. Correcciones de pK y Fuerza Iónica (u):

Los bufferes usados en los estudios cinéticos fueron preparados a fuerza iónica constante (Segel, 1976) agregando una sal neutra como KCl.

El pK_a del componente del buffer fue usado para calcular la fuerza iónica del buffer a 25°C en los estudios de pH. El buffer de trietanolamina a pH 8.0 fue usado en los estudios de temperatura. Ya que el pK_a de este buffer cambia con la temperatura, los pK_a de la trietanol amina a diferentes temperaturas fueron utilizados para calcular la fuerza iónica. La fuerza iónica total de todos los buffer usados fue $u = .031$. Este valor incluye los iones del buffer, el MnSO_4 y el KCl. La Tabla 3.2 muestra los datos obtenidos en estos cálculos.

7. Estabilización de la Proteína:

Las isozimas purificadas se mantuvieron en el congelador en un buffer de alta fuerza iónica conteniendo glicerol al 50%. Las isozimas fueron diluidas en buffer trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4, conteniendo BSA al 1%, y mantenidas sobre hielo durante el experimento. La actividad de la enzima fue monitoreada cada tres horas durante los experimentos. No se observó disminución de la actividad en

TABLA 3.2 CORRECCIONES DE FUERZA IONICA CONSTANTE DE LOS
BUFFERS PARA ESTUDIOS DE pH Y TEMPERATURA.

CORRECCIONES PARA ESTUDIOS DE pH A 25°C							
BUFFER	CONC. M*	pH	pK _{a1}	BUFFER u**	MnSO ₄ u	KCL u	TOTAL u
IMIDA-							
ZOL /Cl ⁻	.033	6.5	7.07	.025	.006	-	.031
"	.033	7.0	7.07	.016	.006	.009	.031
TRITANOL							
AMINA/Cl ⁻	.030	7.4	7.762	.025	.006	-	.031
"	.030	8.0	7.762	.014	.006	.011	.031
TRIS/CL ⁻	.030	8.5	8.10	.009	.006	.016	.031
"	.030	9.0	8.10	.003	.002	.026	.031

CORRECCIONES PARA ESTUDIOS DE TEMPERATURA A pH 8.0							
BUFFER	CONC. M	T°C	pK _{a1}	BUFFER u	MnSO ₄ u	KCL u	TOTAL u
TRITANOL							
AMINA/CL ⁻	.030	10°	8.067	.0155	.006	.0095	.031
"	.030	15°	7.963	.0143	.006	.0107	.031
"	.030	20°	7.861	.0126	.006	.0124	.031
"	.030	25°	7.762	.0110	.006	.0140	.031
"	.030	30°	7.666	.0095	.006	.0155	.031
"	.030	35°	7.570	.0081	.006	.0169	.031

* M = Concentracion Molar

** u = Fuerza ionica

diluciones mantenidas de 8 a 10 horas a 4°C. La isozima muscular (IDH-C₂) diluida en buffer sin BSA pierde su actividad gradualmente. Después de 4 horas, no se detectó actividad alguna; por lo tanto, siempre se agregó BSA al buffer para diluir las isozimas.

8. Determinación de Proteína:

La concentración de proteína de las isozimas purificadas fue determinada de la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{280} = 1.27$ (Illingworth y Tipton, 1970). En todos los cálculos se utilizó el peso molecular de 90,000 como fue determinado (ver Capítulo II).

C. PROCEDIMIENTOS CINETICOS

Las mediciones de velocidad (OD₃₄₀/min) fueron hechas por el método de cinética de estado-constante (steady-state kinetics), usando un espectrofotómetro Beckman Acta C-III U.V.-visible con doble haz conteniendo un sistema automático para muestras que monitorea cuatro reacciones secuencialmente. El cambio de absorbancia de cada celda (4) fue registrada cada 15 segundos y convertida en un registrador digital por medio de un teletipo interacoplador Beckman 52700 adaptado al espectrofotómetro.

Las reacciones enzimáticas fueron mantenidas a temperatura constante (+ 0.5°C) por medio de un baño circulador

de temperatura constante Haake T52-T33 conectado al compartimiento de muestras del espectrofotómetro. La temperatura de las celdas fue monitoreada con un termostato de platino.

Los ensayos fueron hechos en celdas de 3 ml (trayectoria de luz de 1 cm), y el buffer, sales, substrato y coenzima fueron agregados y mezclados simultáneamente con una pequeña barra magnética de agitación, colocada en cada celda y sobre un agitador magnético. La mezcla de reacción se dejó equilibrar a la temperatura deseada dentro de la cámara de muestras del espectrofotómetro. La reacción se inició con la adición de enzima.

La agitación continua de la mezcla durante la reacción se logró con pequeñas barritas magnéticas de agitación dentro de cada celda activadas por medio de un agitador magnético localizado debajo de ellas. Cuando los ensayos enzimáticos fueron determinados a 10°C, la condensación del agua en las paredes de las celdas se eliminó inyectando una corriente suave de aire seco previamente pasado a través de Drierita. El buffer usado en los experimentos fue siempre colocado dentro del baño de temperatura a la temperatura usada en el ensayo, con el objeto de lograr un rápido equilibrio de la temperatura deseada en la mezcla antes de que la reacción se llevara a cabo. Después de cada ensayo, las celdas se enjuagaron tres veces con agua destilada y desionizada.

Antes de llevar a cabo cualquier estudio de cinética enzimática, se establecieron los límites de linealidad de todo el intervalo del ensayo usando diferentes niveles de enzima. También se llevó a cabo una determinación de las concentraciones adecuadas de metal, sustrato y coenzima. Estas determinaciones se hicieron en presencia de altos niveles de sustratos para observar su efecto sobre la reacción catalizada. El buffer usado en estos estudios fue trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4 y MnSO_4 2 mM, DL-isocitrato 4 mM y NADP 100 μM , cuando éstos se mantuvieron a concentración constante.

D. ESTUDIOS DE TEMPERATURA Y PH

1. Estudios cinéticos a temperatura (25°C) y pH (7.4)

constantes:

Los ensayos enzimáticos fueron hechos por cuadruplicado en celdas de 3 ml con mezclas de reacción conteniendo trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4, MnSO_4 1.5 mM y varias concentraciones de sustrato y cofactor incrementados geométricamente. En todos los casos la talla de las matrices fue de 5 x 4 con 5 niveles de isocitrato y 4 niveles de NADP, dando un total de 80 ensayos individuales. Un mínimo de tres experimentos de cada tipo fue llevado a cabo para cada isozima. La reacción fue iniciada por adición de la enzima, la cual fue mantenida sobre hielo a una

dilución apropiada y estabilizada con BSA. Algunos ensayos se llevaron a cabo en celdas de 30 ml y 10 cm de trayectoria de luz. Como no se observaron diferencias en los valores de los parámetros cinéticos, todos los estudios se llevaron a cabo en celdas de 3 ml y 1 cm de trayectoria de luz.

2. Estudios cinéticos a temperatura constante (25°C) y pH variable:

Estos estudios fueron llevados a cabo solamente con dos isozimas: la forma citoplásmica del hígado (IDH-B₂) y la forma mitocondrial del músculo (IDH-A₂). La forma mitocondrial del hígado (IDH-A₂) mostró alta inestabilidad durante su aislamiento y purificación. Ya que el rendimiento de ésta fue muy bajo, no fue posible llevar a cabo estudios de cinética mas detallados.

El efecto del pH sobre los parámetros cinéticos fue estudiado a seis diferentes pH: 6.5, 7.0, 7.4, 8.0, 8.5 y 9.0 a 25°C. Los parámetros cinéticos V_{max} y K_m fueron determinados por el método de matrices (5 x 4) usando cinco niveles de sustrato y cuatro niveles de coenzima, incrementados geométricamente. Diferentes buffers fueron usados dependiendo del pH del ensayo. La mezcla de reacción contuvo MnSO₄ 1.5 mM, y varias concentraciones de isocitrato y NADP. La fuerza iónica (u) fue mantenida constante agregando cantidades apropiadas de KCl. La mezcla de reacción contuvo MnSO₄ 500 uM cuando se utilizó un pH de 9.0. Se corrieron ensayos por

cuadruplicado y se llevaron a cabo un mínimo de tres experimentos de cada tipo. La reacción se inició por adición de la enzima.

3. Estudios cinéticos a pH constante (8.0) y temperatura variable:

Estos estudios se llevaron a cabo con las isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂. El efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos fue investigada a seis diferentes temperaturas: 10°, 15°, 20°, 25°, 30° y 35°C a pH 8.0.

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para el sustrato y la coenzima fueron obtenidos a concentraciones saturadas ya sea de sustrato o de coenzima. Las molaridades de ambos fueron variadas geométricamente. De cinco a seis diferentes concentraciones fueron corridas por cuadruplicado y cada experimento se repitió por lo menos tres veces. Entonces, de 60 a 90 ensayos individuales fueron corridos en total para cada temperatura y para cada isozima.

Los ensayos se llevaron a cabo en celdas de 3 ml y la mezcla de reacción contuvo buffer trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 8.0, $MnSO_4$ 1.5 mM y isocitrato 2 mM cuando el NADP fue variado, y NADP 100 μM cuando el isocitrato fue variado. La reacción se inició por adición de enzima diluida.

E. PROCESAMIENTO DE DATOS

1. Estimación de velocidades iniciales:

Las velocidades fueron obtenidas por medio del análisis de mínimos cuadrados (no ponderado) de los primeros 8 a 10 puntos (2 a 2.5 minutos) de la reacción y los ensayos por cuadruplicado fueron promediados para cada punto. Las pendientes calculadas por regresión lineal fueron obtenidas con una calculadora tipo TI-55.

2. Estimación de las constantes cinéticas:

Una estimación preliminar de los parámetros cinéticos fue obtenida por medio del método lineal directo no-paramétrico de Eisenthal y Cornish-Bowden (1974). Este método permite una rápida estimación de los parámetros sin necesidad de cálculos y facilita el reconocimiento de observaciones experimentales inadecuadas. Entonces, las velocidades fueron primero graficadas como trazos lineales directos o como gráficas de Hanes-Woolf que también dan una línea recta. Estas gráficas fueron usadas principalmente en aquellos experimentos donde uno de los sustratos se variaba, mientras los otros se mantenían a concentraciones saturadas. En experimentos bajo condiciones de no saturación de sustrato y coenzima, las velocidades se graficaron como trazos primarios (Cornish-Bowden, 1979).

Las constantes cinéticas K_m y V_{max} fueron calculadas por medio de una computadora DEC-10 y el método de regresión paramétrico ponderado de Cleland (1967), el cual emplea un análisis no-lineal de mínimos cuadrados.

En los trazos lineales, los datos se ajustaron a la ecuación: $v = V[A]/K + [A]$ donde v es la velocidad inicial, V es la velocidad máxima, i.e., valor de v con saturación de isocitrato y NADP, A es la concentración de sustrato (isocitrato) para la reacción hacia la derecha y K es la constante de Michaelis, i.e., concentración de sustrato cuando $v = V/2$.

El programa FORTRAN de Cleland para esta ecuación fue identificado como HYPLIT FOR.

En los trazos primarios, los datos se ajustaron a la ecuación: $v = V[A][B]/K_{1a} K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B]$ donde B es la concentración de coenzima (NADP) para la reacción hacia la derecha; K_{1a} es la constante de disociación en equilibrio verdadera para el complejo NADP-IDH cuando la concentración de isocitrato tiende a cero; K_a es la constante de Michaelis limitante para la coenzima (NADP) cuando las concentraciones de isocitrato tienden hacia saturación, y K_b es la constante de Michaelis limitante para isocitrato cuando la concentración de NADP se aproxima a saturación. Esta ecuación supone ausencia de productos y que no hay inhibición por sustrato.

El programa FORTRAN de Cleland para esta ecuación fue identificado como SEQOLD FOR.

3. Análisis Estadístico de los Parámetros Cinéticos:

Se llevaron a cabo pruebas estadísticas y análisis de los parámetros cinéticos por medio de procedimientos estadísticos estándar (Brownlee, 1960; Bevington, 1969; Drapper y Smith, 1981).

4. Estimación de los Parámetros Termodinámicos:

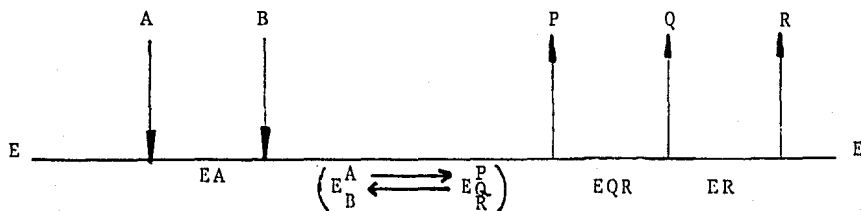
Los parámetros termodinámicos de activación fueron analizados por análisis simple de regresión lineal (método de mínimos cuadrados ordinario). Los parámetros se calcularon con la ecuación de Arrhenius (Segel, 1975) y las pendientes fueron obtenidas con una calculadora tipo TI-55.

F. FORMULACIONES TEORICAS

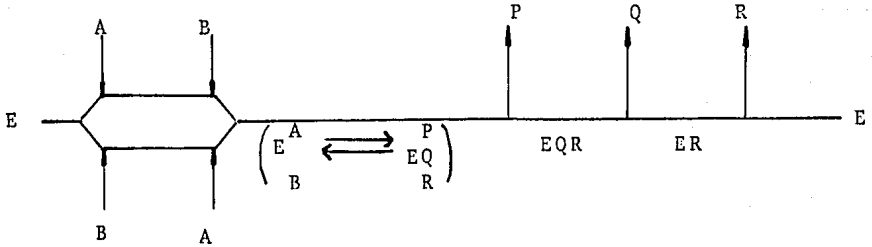
Varios tipos de mecanismos han sido propuestos para la dehidrogenasa isocítrica NADP-específica. Estudios cinéticos de estado constante con NADP-IDH de corazón de puerco (Uhr *et al*, 1974; Northrop y Cleland, 1974), corazón de res (Dalziel *et al*, 1978; Londesborough y Dalziel, 1970) y *Salmonella thyphimurium* (Marr y Weber, 1973) han sugerido mecanismos aleatorios, i.e., sin orden obligatorio de adición de sustratos y salida de productos. Por otro lado, estudios cinéticos con NADP-IDH de *Rhodopseudomonas spheroides* indican un mecanismo ordenado, i.e., orden obligatorio de adición de sustratos y liberación de productos (Buzdygon *et al*, 1973). En NADP-IDH de *Mytilus edulis* se ha propuesto un mecanismo de adición aleatoria de sustratos y salida ordenada de productos (Head, 1980).

En la notación de Cleland (1963,1970) los diferentes mecanismos de reacción pueden ser representados como sigue:

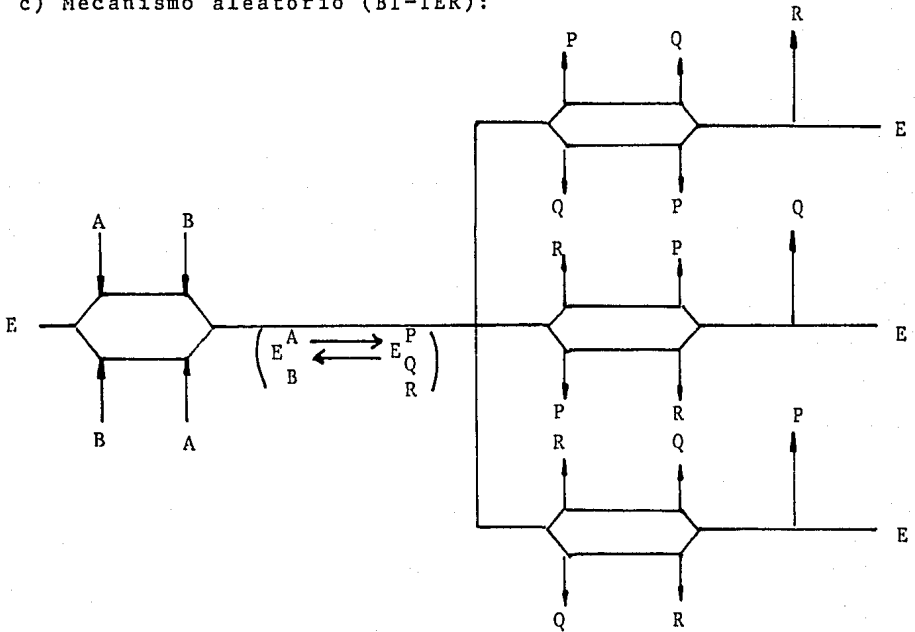
a) Mecanismo ordenado (BI-TER):



b) Mecanismo aleatorio - ordenado (BI-TER):



c) Mecanismo aleatorio (BI-TER):



donde, E es la enzima (IDH), A es el primer sustrato (NADP), B es el segundo sustrato (isocitrato), EAB y EPQR son los complejos enzima-sustratos y enzima-productos, P es el primer producto (CO_2), Q es el segundo producto (α -cetoglu-tarato) y R es el tercer producto (NADPH).

Aunque diferentes mecanismos de adición de sustratos y liberación de productos se han propuesto, todos ellos son mecanismos bireactantes secuenciales para la reacción hacia la derecha. Los sustratos forman complejos ternarios de sustratos y enzima, y los productos pueden disociarse liberando a la enzima. Las deshidrogenasas específicas para nucleótidos de piridina (NADP o NAD) tienen este tipo de mecanismo.

La ecuación para la reacción hacia la derecha de los mecanismos bireactantes, en ausencia de productos se reduce a: $v = V[A][B]/(K_{ia} K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B])$ (ec. 1) la cual es verdadera para todos los mecanismos bireactantes secuenciales ordenados tales como BI UNI, BI BI, BI TER. Esta ecuación también se aplica a equilibrios rápidos aleatorios tipo BI BI o BI TER, en los cuales todos los otros pasos excepto la conversión central de EAB \rightleftharpoons EPQR están en rápido equilibrio (Roberts, 1977).

Las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus obedecen un mecanismo complejo ternario como es el caso de otras deshidrogenasas-NADP y los datos cinéticos son descritos adecuadamente por la ecuación 1. Cuando esta ecuación es escrita específicamente para la reacción de IDH, se obtiene la ecuación 2:

$$v = (V_{\max}^{f} [NADP][isoc]) / (K_{ia}^{NADP} K_m^{isoc} + K_m^{isoc} [NADP] + K_m^{NADP} [isoc] + [NADP][isoc]) \quad (\text{ec. 2})$$

donde v representa la tasa inicial, V^f_{\max} es la velocidad máxima para la reacción hacia la derecha, $[NADP]$ es la concentración del primer sustrato (coenzima), $[isoc]$ es la concentración de segundo sustrato (isocitrato), K_{1a}^{NADP} es la constante de equilibrio de disociación verdadera para el complejo IDH-NADP cuando la concentración de isocitrato tiende a zero, $K_{m^{isoc}}$ y $K_{m^{NADP}}$ son las constantes de Michaelis limitantes para el sustrato y la coenzima respectivamente, cuando la concentración de NADP o isocitrato se aproximan a saturación (Cornish-Bowden, 1979).

Una indicación de que las isozimas IDH obedecen un mecanismo complejo ternario secuencial es dado por una familia de líneas que intersectan en el eje vertical izquierdo de un trazo primario (ver Figuras 3.4A, B y C). Aunque los datos cinéticos de la isozimas IDH se ajustan adecuadamente a la ecuación 2, estos datos por sí mismos no revelan nada acerca de el orden de adición de NADP o isocitrato. Tal distinción solamente puede ser hecha con estudios de enlace y de inhibición por productos (Uhr *et al*, 1974; Northrop y Cleland, 1974).

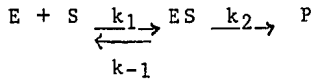
En ausencia de productos y a saturación de NADP, la ecuación 2 se convierte en la ecuación simple de Michaelis-Menten:

$$v = V^f_{\max} [isoc] / (K_{m^{isoc}} + [isoc]) \quad (\text{ec. 3})$$

Si $P = 0$, $V_{\max} = K_{cat} \cdot e_0$; $K_m = k_{-1}k_2/k_1$ y

$K_s = k_{-1}/k_1$. El valor numérico de K_m no es idéntico a la constante de disociación del complejo E-S, entonces $K_m \neq K_s$.

Para el siguiente esquema



el mecanismo Michaelis-Menten supone que el complejo E-S está en equilibrio termodinámico con la enzima libre (e_0) y el sustrato (S). Esto es verdad solamente si $k_2 \ll k_{-1}$, entonces $K_m = K_s$ (Fersht, 1977). Para muchas enzimas la K_m es una aproximación de la afinidad de la enzima por el sustrato cuando se sabe que k_2 es mucho menor que k_{-1} . Si suponemos que (i) la ecuación simple de Michaelis-Menten es válida para una reacción más compleja (BI-TER), a pesar de las diferencias en mecanismo, (ii) que el complejo E-S se disocia lentamente ($k_2 \ll k_1$), (iii) que la estimación de K_m es un valor aproximado del nivel intracelular del sustrato (Cleland, 1970; Cornish-Bowden, 1976), y (iv) que K_m indica la "disponibilidad" relativa del sustrato para la enzima, i.e., mientras más bajo el valor de K_m , mayor ambos la afinidad aparente del sustrato para la enzima y la V_{max}/K_m , entonces los valores de K_m reflejarán la afinidad de la enzima (IDH) por sus sustratos (NADP o isocitrato).

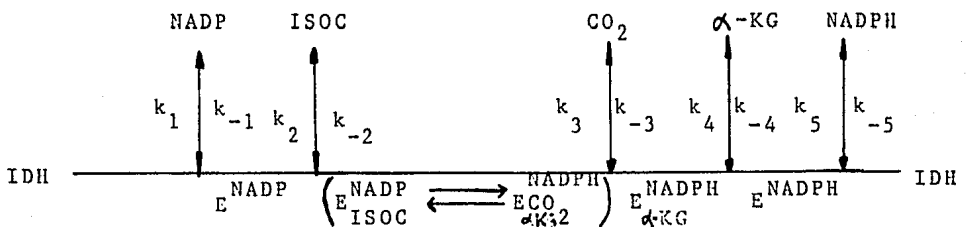
A muy bajas concentraciones de sustrato ($[isoc] \ll K_m^{isoc}$), la velocidad inicial (v) es directamente pro-

porcional a la concentración de isocitrato y se convierte en una pseudo reacción de primer orden. En donde:

$v = (V^f_{\max}/K_m)[\text{isoc}]$, y $V^f_{\max}/K_m[\text{isoc}]$ es una pseudo tasa constante de primer orden. Si la enzima es considerada como reactante, entonces k_{cat}/K_m es la tasa constante de segundo orden, y la ecuación apropiada es $v = (k_{\text{cat}}/K_m)e_0[\text{isoc}]$ cuando $[\text{isoc}] \ll K_m[\text{isoc}]$.

Cuando las molaridades de NADP e isocitrato son muy grandes comparadas con sus respectivas K_m , la ecuación 3 se simplifica a $v = V^f_{\max}$. Bajo tales condiciones, k_{cat} y e_0 determinan la tasa de la reacción. Entonces, k_{cat} , k_{cat}/K_m y e_0 son los parámetros cinéticos importantes bajo las diferentes concentraciones de sustrato fijadas.

Suponiendo que las isozimas IDH siguen un mecanismo ordenado BI TER, en la notación de Cleland, el mecanismo de reacción puede ser representado como sigue:



donde, E es la enzima IDH, y k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 ,

k_{-1} , k_{-2} , k_{-3} , k_{-4} y k_{-5} son las tasas constantes

de la reacción. El complejo central contiene los complejos enzima-sustratos y enzima-productos.

Entonces, para la reacción hacia la derecha (descarboxilación oxidativa de isocitrato), los parámetros cinéticos de IDH y las expresiones conteniendo las tasas constantes* apropiadas son las siguientes:

$$K_m^{NADP} = k_3 k_4 k_5 / k_1 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)$$

$$K_m^{isoc} = \frac{k_4 k_5 (k_3 + k_{-2})}{k_2 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)}$$

$$V_{fmax} = k_3 k_4 k_5 / (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4) e_0$$

donde todas las k representan las diferentes tasas constantes de la reacción y e_0 la concentración inicial de enzima.

la expresión:

$$V_{fmax} / e_0 = k_3 k_4 k_5 / k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4$$

es igual a k_{cat} (constante catalítica), la tasa constante aparente de primer orden para la catálisis máxima, y k_{cat}/K_m es la tasa constante aparente de segundo orden. Entonces, la expresión $v = (k_{cat} \cdot e_0 / K_m^{isoc}) [isoc]$, cuando $[isoc] \ll K_m^{isoc}$, contiene ambas constantes que determinan la cinética total de la reacción (Cleland, 1975).

Para comparaciones a altos niveles de isocitrato, se usó la expresión V_{max} o su equivalente expresión $k_{cat} \cdot e_0$. A bajas concentraciones de sustrato, se usó la expresión V_{max}/K_m^{isoc} o $k_{cat} \cdot e_0 / K_m^{isoc}$. La expresión equivalente que contiene las constantes es:

$$V_{fmax} / K_m^{isoc} = (k_2 k_3 / k_3 + k_{-2}) e_0, \text{ la cual re-}$$

fleja la contribución de tres constantes durante el proceso

*Ver Apendice I.B

catalítico. La expresión $v_{\max}^f/K_m^{\text{NADP}}$ (i.e., $k_{\text{cat}} \cdot e_0 / K_m^{\text{NADP}}$), o su equivalente expresión de la tasa constante: $v_{\max}^f/K_m^{\text{NADP}} = k_1 \cdot e_0$ la cual representa la constante de enlace del NADP.

G. RESULTADOS

1. Inactivación de Deshidrogenasa Isocítrica por Dilución:

Cuando la enzima fue diluida en el buffer trietanol amina/ Cl^- pH 7.4 la actividad de ésta disminuyó con el tiempo. La tasa de inactivación siguió un proceso de primer orden. Protección contra inactivación fue lograda con adición de BSA al 1% a cualquier concentración de enzima (Fig.3.1).

Aliquotas de enzima mantenidas sobre hielo fueron removidas a diferentes tiempos y ensayadas con la solución sustrato estandar: MnSO_4 2 mM, NADP 100 μM , DL isocitrato 4 mM en buffer trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4 a 25°C. Protección contra inactivación es también provista por los sustratos: Mn^{2+} , NADP e isocitrato.

Inactivación de la enzima durante dilución ha sido también observada en la NADP-IDH de hígado de res (Carrier y Pantaloni, 1978). Ellos encontraron que el DTT (Ditiotreitol 10 mM) o EDTA (1-5 μM) era suficiente para prevenir la inactivación por varias horas. Protección total es provista por el complejo de sustratos manganeso-isocitrato. Así, ellos indican que siguiendo la dilución, la oxidación de un grupo sulfhidrilo es envuelto en el proceso de inactivación.

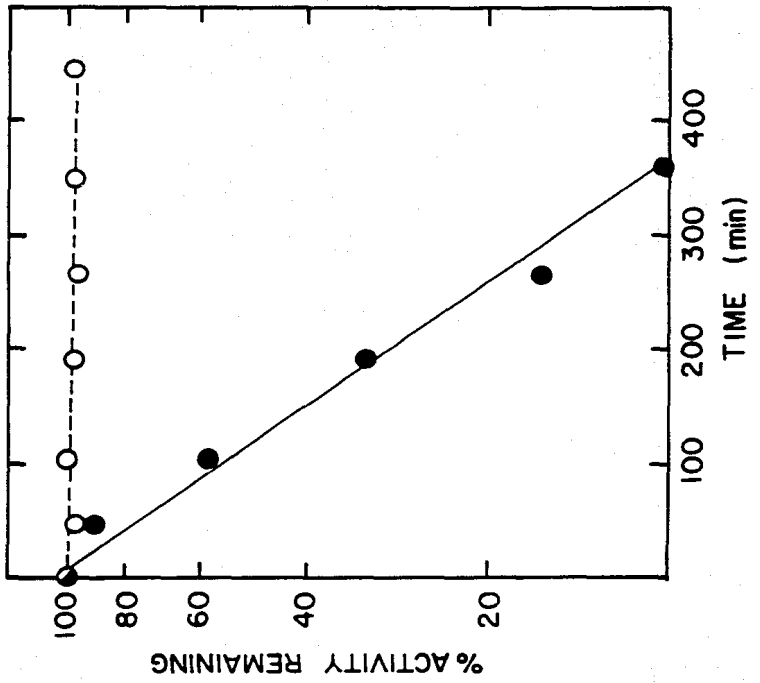
2. Linearidad de los ensayos enzimáticos:

A cualquier concentración de sustrato la velocidad inicial (v) es directamente proporcional a e_0 y la relación entre v

FIGURA 3.1 Representación del curso del tiempo de reacción durante la inactivación de la deshidrogenasa isocítrica NADP-específica después de dilución. Buffer: trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4.

(○) Con albumina de suero de bovino (BSA) al 1% (w/v)

(●) Sin BSA.



y e_0 es lineal sólo si se miden velocidades iniciales verdaderas (Segel, 1976), y si se usan apropiadas concentraciones de enzima. La Figura 3.2A muestra cuatro gráficas tipo Eadie-Hofstee de los datos de la isozima IDH-C₂. Se obtuvieron líneas rectas cuando se utilizaron niveles de enzima de .0013 U/ensayo a .0046 U/ensayo. Sin embargo, a niveles de actividad enzimática de aproximadamente .0051 U/ensayo se observó una marcada no-linearidad. La Figura 3.2B muestra las K_m del isocitrato graficadas en función de V_{max} .

Hasta una velocidad máxima de aproximadamente 26×10^{-2} uM/min/ml, las K_m del isocitrato son independientes de los niveles de enzima. Sin embargo, a mayor actividad enzimática, la K_m empieza a ser dependiente del nivel de enzima. Por lo tanto, las constantes cinéticas fueron determinadas a niveles de actividad enzimática de .0025 a .0035 U/ensayo.

3. Velocidad inicial a altas molaridades de sustratos:

Las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específica son completamente inactivas en ausencia del ión metálico divalente como magnesio o manganeso, y es más activa en presencia de Mn^{2+} que Mg^{2+} . La NADP-IDH de otras fuentes animales tiene de dos (Carlier y Pantaloni, 1973) a 1.5 veces (Head y Gabbott, 1980) más actividad con Mn^{2+} que con Mg^{2+} . Estos hallazgos concuerdan con otras

FIGURA 3.2A Gráficas representativas tipo Eadie-Hofstee para las isozimas IDH ilustrando los diferentes niveles de enzima en los cuales el ensayo permanece lineal. A niveles de enzima de .0051 U/ensayo se observa una marcada falta de linealidad en las zonas de baja concentración de isocitrato.

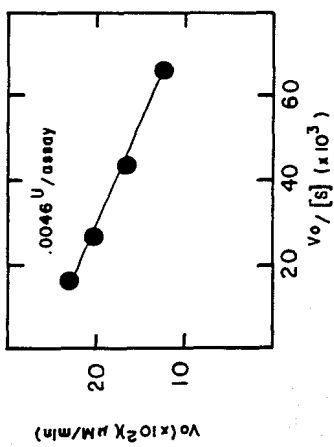
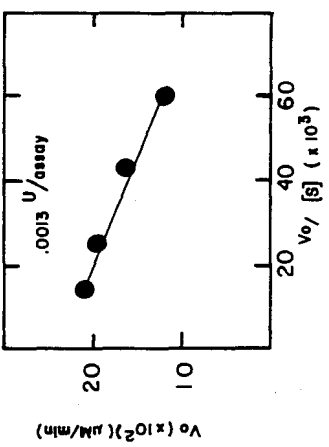
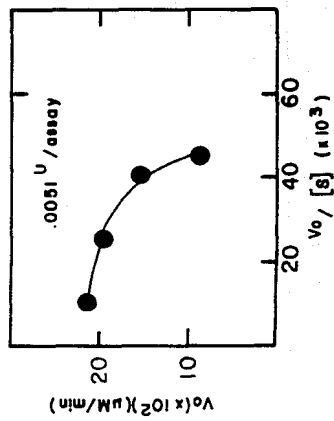
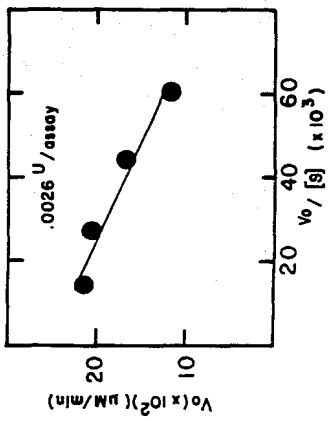
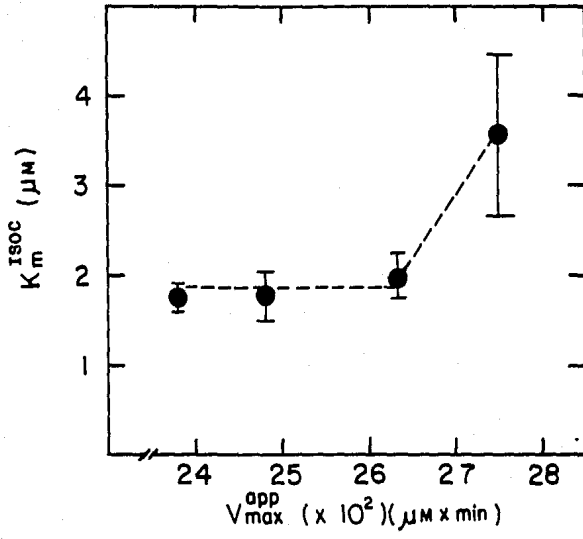


FIGURA 3.2B Gráfica representando el efecto de la velocidad máxima (V_{max}) aparente sobre los valores de la constante de Michaelis (K_m) para el isocitrato. La regraficación de los parámetros enzimáticos obtenidos de las gráficas de la figura 3.3A ilustran la dependencia lineal de la K_m arriba de un valor de V_{max} aparente de aproximadamente 0.2635 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$.



enzimas NADP-IDH de bacteria (Reeves et al, 1972) y mamíferos (Siebert et al, 1957a y b; Colman, 1968).

La isozimas deshidrogenasa isocítrica del músculo y citoplasma del hígado de Fundulus heteroclitus no exhibieron inhibición a concentraciones de manganeso de 5 y 3 mM respectivamente, pero a mayores concentraciones una ligera disminución en las velocidades iniciales fue observada (Figura 3.3 A yB). Por lo tanto, los estudios de cinética enzimática se llevaron a cabo con concentraciones de manganeso abajo de esos niveles.

La NADP-IDH del hígado de res (Carlier y Pantaloni, 1973), glándula mamaria de bovino (Farrell, 1980), y corazón humano (Seelig y Colman, 1978) mostraron inhibición a concentraciones de manganeso mayores de 10 mM, 1.5 mM y 3.0 mM respectivamente. Esto indica un diferente modo de acción del manganeso sobre el proceso catalítico ya que la NADP-IDH de diferentes fuentes animales tiene diferentes requerimientos del ion metálico divalente.

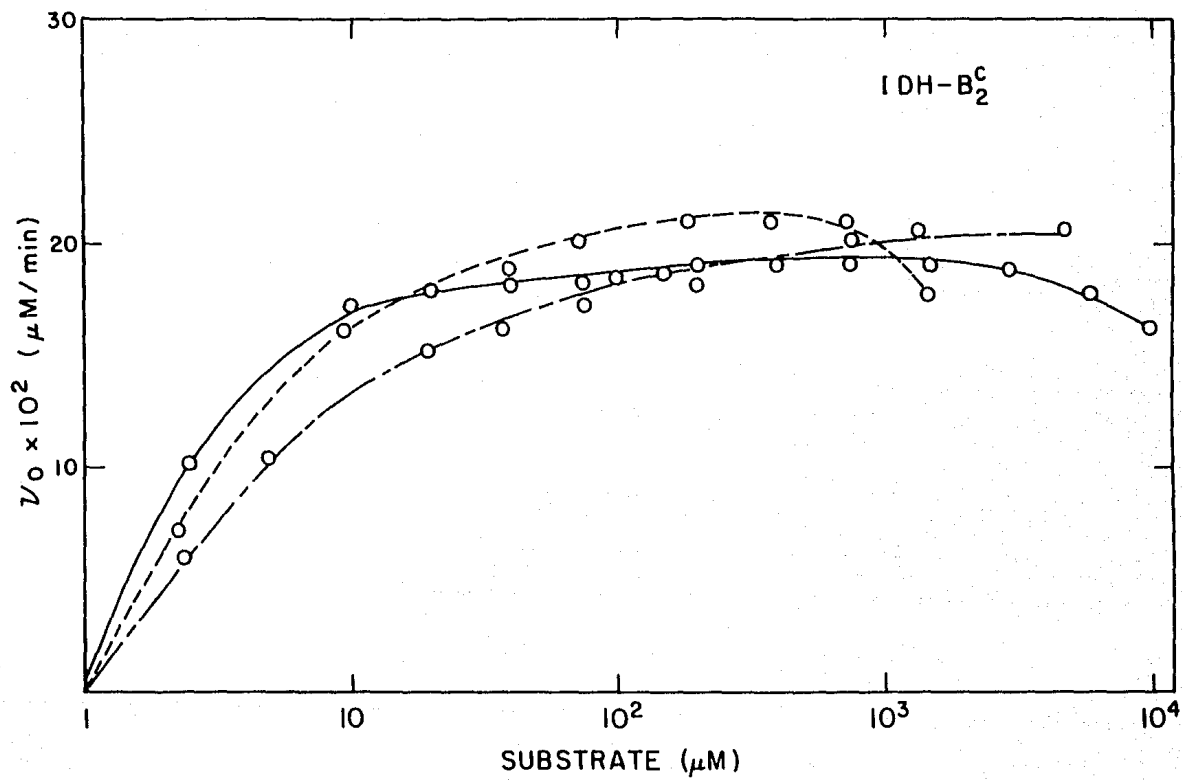
Estudios similares se llevaron a cabo usando diferentes concentraciones de isocitrato y NADP con objeto de evaluar el efecto del sustrato y la coenzima sobre la velocidad de la reacción. Las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas no exhibieron inhibición por sustrato hasta una concentración de 5 mM. A mayores concentraciones se observó una ligera inhibición. En el caso de

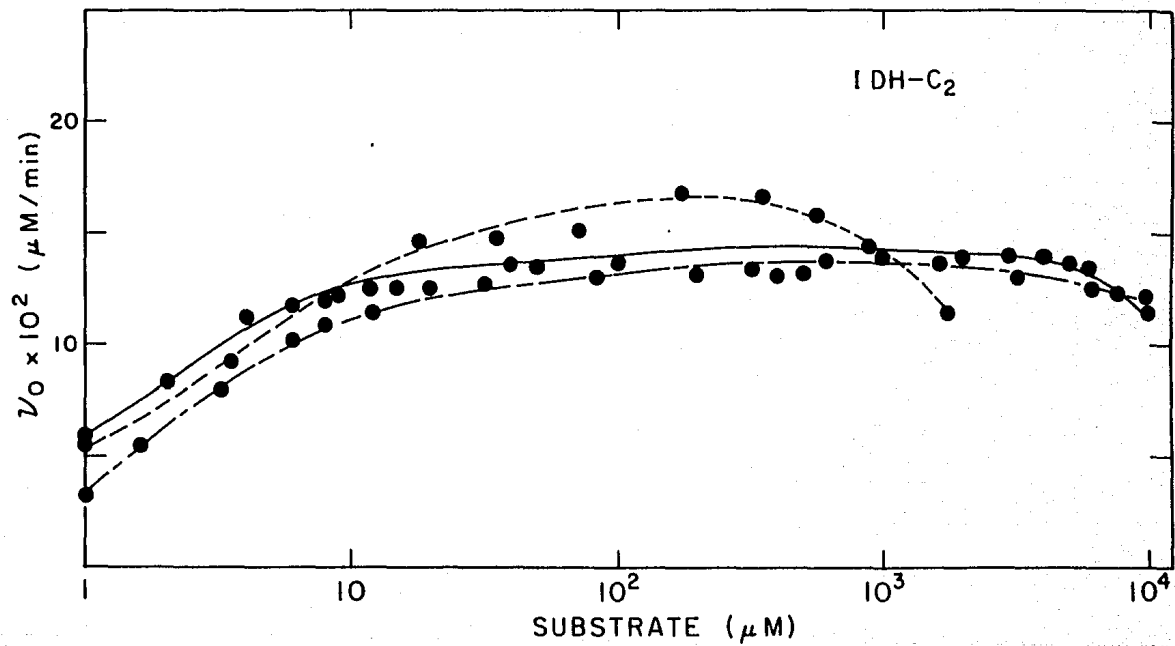
FIGURA 3.3 Estudios de velocidad inicial a altos niveles de sustratos. Las concentraciones fueron las siguientes: Mn^{2+} : 2.5×10^{-6} M a 0.01 M, isocitrato: 2.5×10^{-6} M a .005 M, NADP: 9.4×10^{-6} M a .0015 M. Buffer: trietanol amina/ Cl^{-} 30 mM pH 7.4.

Mn^{2+} (— —), isocitrato (——), NADP (----)

(○) Los círculos blancos representan a la isozima IDH-B₂

(●) Los círculos negros representan a la isozima IDH-C₂





NADP, la isozima muscular (IDH-C₂) y del hígado (IDH-B₂) mostraron inhibición a niveles de concentración de NADP mayores de 0.5 mM y 0.7 mM respectivamente (Figura 3.3 A y B). Por lo tanto, los parámetros cinéticos fueron determinados a concentraciones de isocitrato de 2 mM y de NADP de 0.1 mM cuando se utilizaron concentraciones saturadas de cada reactante.

4. Velocidades iniciales a 25°C y pH 7.4 para las isozimas

IDH-A₂, IDH-B₂ y IDH-C₂:

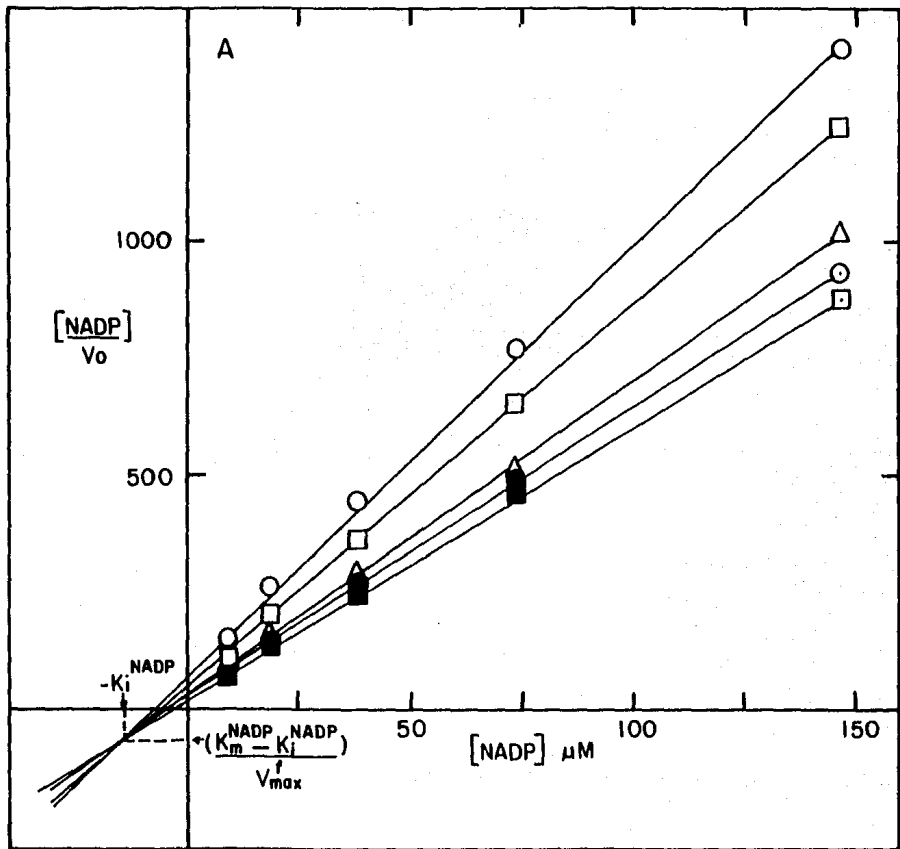
La Figura 3.4A,B y C ilustra los trazos primario y secundarios para la isozima IDH-B₂. Esta clase de gráficos son característicos de enzimas que obedecen un mecanismo complejo ternario secuencial. La Tabla 3.3 muestra un resumen de los parámetros cinéticos para las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus. La constante de Michaelis aparente de isocitrato en ambas isozimas IDH del hígado (IDH-A₂ y IDH-B₂) no mostraron diferencias. Sin embargo, la isozima mitocondrial del musculo (IDH-C₂) exhibe una K_m^{isoc} mayor. Mientras la K_m aparente para NADP no mostró diferencias entre la isozimas IDH-A₂ y IDH-C₂, un valor menor se observó para IDH-B₂. La V^{fmax} exhibió marcadas diferencias entre las tres isozimas. V_{max}/K_m^{isoc} fue mayor para la isozima citoplásmica de hígado, pero idéntica para las isozimas mitocondriales de hígado y musculo. V_{max}/K_m^{NADP} o su expresión equivalente $k_1 \cdot e_0$, la cual representa la

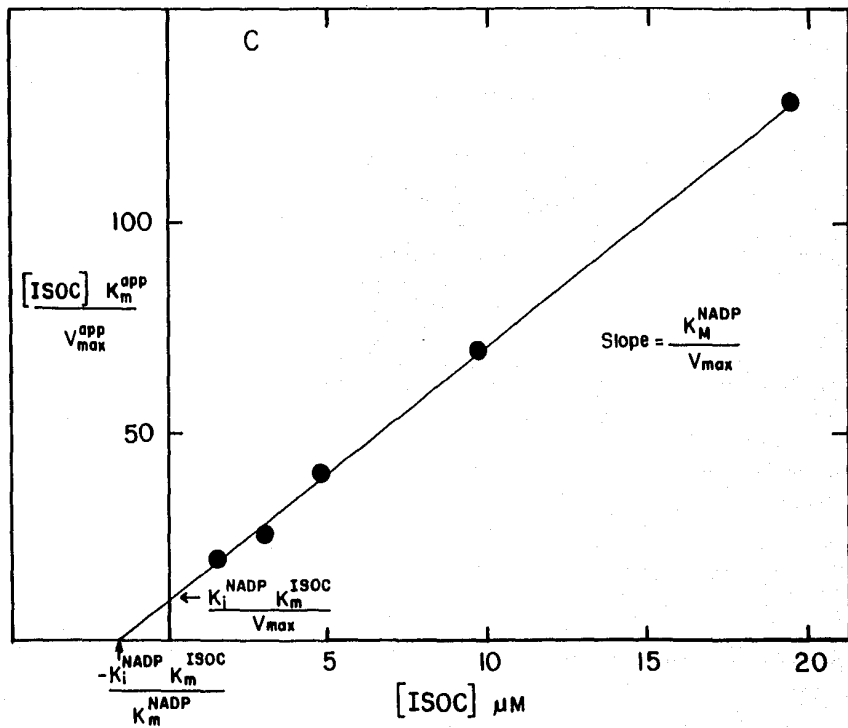
FIGURA 3.4 Gráficas primarias y secundarias representativas de los datos cinéticos de las isozima IDH-B₂. Estas son características de enzimas que siguen un mecanismo complejo ternario secuencial.

(A) Gráfica primaria del cociente $NADP/v_o$ versus la concentración molar de NADP. La grafica fue obtenida del recíproco de la siguiente ecuación: $v = V[A][B] / K_{ia} K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]$, i.e., $1/v = K_a/V (1 + K_{ia}K_b/K_a[B]) (1/[A]) + 1/V (1 + K_b/[B])$, donde $[A] = NADP$, $[B] = isoc.$, $V = V^f_{max}$, K_{ia} - constante de disociación para el complejo IDH-NADP, K = constantes de Michaelis.

B) Gráfica secundaria de las pendientes ($1/V_{max}$) provenientes de la Figura 3.4A multiplicadas por las concentraciones de isocitrato versus las molaridades respectivas de isocitrato. La pendiente es $1/V_{max}$, el intercepto vertical es K_m^{isoc}/V_{max} , y el intercepto horizontal es $-K_m^{isoc}$.

C) Gráfica secundaria de los interceptos K_m/V_{max} provenientes de la Figura 3.4A multiplicadas por las concentraciones de isocitrato versus las molaridades respectivas de isocitrato. La pendiente de la línea es K_m^{NADP}/V^f_{max} , el intercepto vertical es $K_a^{NADP}K_m^{isoc}/V^f_{max}$, y el intercepto horizontal es $K_m^{isoc} - K_a^{NADP}/K_m^{NADP}$.





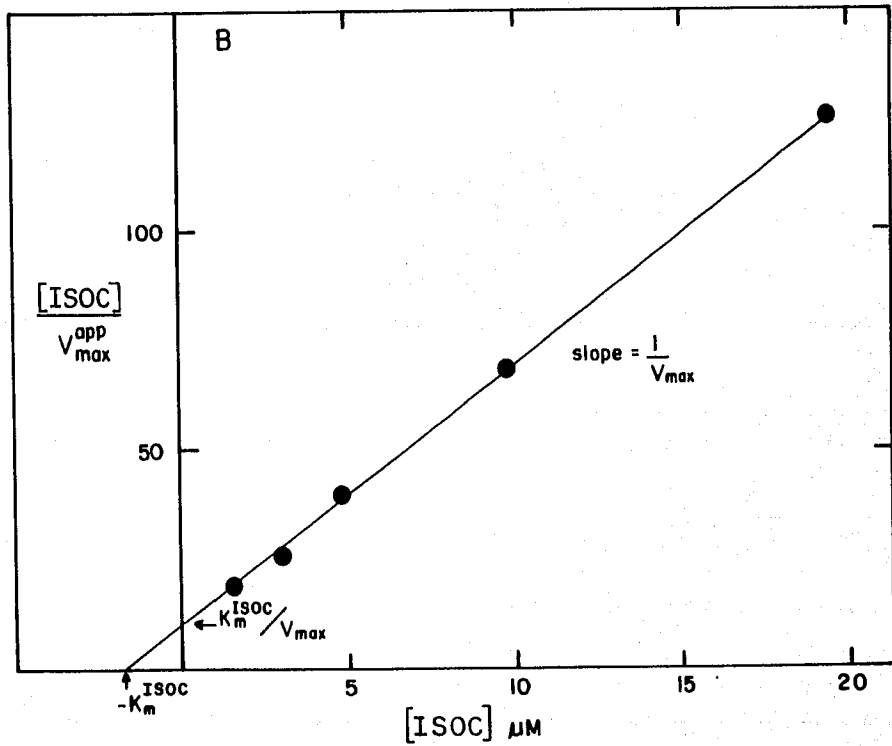


TABLA 3.3 RESUMEN DE PARAMETROS CINETICOS A pH 7.4 Y 25°C
 PARA LAS ISOZIMAS IDH-A₂, IDH-B₂, Y IDH-C₂ DE
Fundulus heteroclitus.

PARAMETROS CINETICOS	DESHIDROGENASA ISOCITRICA		
	IDH-A ₂	IDH-B ₂	IDH-C ₂
	<u>±</u> E.S.	<u>±</u> E.S.	<u>±</u> E.S.
app Km ^{ISOC} (uM)	1.54 <u>±</u> .075	1.58 <u>±</u> .067	2.52 <u>±</u> .084
app Km ^{NADP} (um)	2.37 <u>±</u> .060	1.86 <u>±</u> .117	2.46 <u>±</u> .132
V ^f _{max} (uM/min/mg)	9.50 <u>±</u> .260	15.60 <u>±</u> .158	13.77 <u>±</u> .120
V ^f _{max} /Km ^{isoc}	6.16 <u>±</u> .539	9.87 <u>±</u> .372	5.46 <u>±</u> .155
V ^f _{max} /Km ^{NADP}	4.01 <u>±</u> .637	8.39 <u>±</u> .130	5.59 <u>±</u> .485

constante de enlace de NADP, fue mayor para IDH-B₂ y similar y menor para IDH-C₂ y IDH-A₂.

La Tabla 3.4 muestra un resumen de algunos parámetros cinéticos de la NADP-IDH de varias fuentes animales con el propósito de compararlos con los parámetros cinéticos de Fundulus. En general, la Km para isocitrato de las especies poikilotérmicas es menor que la Km de las especies homeotérmicas, excepto en el corazón de puerco en el cual varios autores muestran ya sea valores bajos (Cleland et al, 1969; Uhr et al, 1974) o valores altos (Colman, 1968). La presencia de bajos valores de Km para el sustrato en los poikiloterms permite a la NADP-IDH enlazar isocitrato a niveles mucho más bajos que la NADP-IDH de los homeoterms. Este puede tener un significado adaptativo ya que los poikiloterms están sujetos a fluctuaciones internas de temperatura.

5. Estudios de pH: velocidades iniciales en función de pH a 25°C para la isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂:

Los parámetros cinéticos de la isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP-específicas son resumidos en la Tabla 3.5. Estos estudios muestran que la Km para el isocitrato y la Vmax (kcat.e₀) son independientes de pH en ambas IDH-B₂ y IDH-C₂ (Figura 3.5A y C). La ligera curvatura en la Figura 3.5A no es estadísticamente significativa. Sin embargo, la Km para isocitrato entre las isozimas fue

TABLA 3.4 ALGUNOS PARAMETROS CINETICOS PARA LA DESHI-DROGENASA ISOCITRICA NADP ESPECIFICA EN DIFERENTES TEJIDOS.

FUENTE DE NADP-IDH	K _m ^{isoc} (uM)	K _m ^{NADP} (uM)	pH ensayo	REFERENCIA
CORAZON DE RES MIT.	8.3	1.4	-	Higashi <u>et al</u> ,
" " CITOPL.	8.3	3.3	7.4	1965.
CORAZON DE PUERCO	5.7	4.6	7.4	Colman, 1968.
" " "	0.5	0.1	6.8	Cleland <u>et al</u> ,
				1969.
<u>Bacillus stearo-</u> <u>thermophilus</u> (50°C)	6.0	4.5	7.5	Howard y Becker
<u>Escherichia coli</u>	15.6	37.0	7.5	1970.
				Reeves <u>et al</u> ,
				1972.
CORAZON-RATA MITO.	5.0	20.0	7.5	Islam <u>et al</u> ,
HIGADO-RATA CITO.	3.0	25.0		1972.
<u>Azotobacter</u>	17.0	20.0	7.2	Wicken <u>et al</u> ,
<u>vineelandii</u>				1972.
<u>Salmonella</u>	1.3	12.0	7.7	Marr & Weber,
<u>typhimurium</u>				1973.
HIGADO DE RES	-	2.75	7.8	Carlier y Pan-
				taloni, 1973.
CORAZON-PUERCO MIT.	1.20	0.36	6.8	Uhr <u>et al</u> ,
" " CITO.	0.56	0.19		1974.
HIGADO DE PUERCO	2.8	4.6	6.8	Colman, 1975.
CORAZON HUMANO	4.6	6.8	7.4	Seelig & Col-
				man, 1978.
CORAZON-RATON MIT.	12.5	5.0	8.0	Pegoraro
RINON-RATON CITO.	7.8	5.0		<u>et al</u> , 1979.
<u>Drosophila</u>	23.0	14.6	-	Williamson
				<u>et al</u> , 1980.
ALMEJA- <u>M. edulis</u>	3.2	3.0	7.5	Head, 1980.
<u>M. edulis</u> MANTO	2.7	3.3	7.5	Head & Gabbott,
GLANDULA DIGESTIVA	2.2	2.0		1981.
<u>F. heteroclitus</u>				
HIGADO-MITOCON.	1.54	2.37	7.4	Esta tesis
HIGADO-CITOPL.	1.58	1.86	7.4	" "
MUSCULO-MITOCON.	2.52	2.46	7.4	" "

TABLA 3.5 PARAMETROS CINETICOS PARA IDH-B₂ Y IDH-C₂ EN FUNCION DE pH A 25°C.

pH	*K _m ^b (±E.S.)	K _m ^a (±E.S.)	IDH-B ₂		
			**V _{max} (±E.S.)	V _{max} /K _m ^b (±E.S.)	V _{max} /K _m ^a (±E.S.)
6.5	1.67 (±.064)	2.91 (±.133)	15.34 (±.501)	9.19 (±.893)	5.27 (±.576)
7.0	1.50 (±.145)	2.01 (±.148)	15.14 (±.929)	10.10 (±.806)	7.53 (±.797)
7.4	1.41 (±.129)	1.86 (±.147)	15.80 (±.888)	11.20 (±.837)	8.50 (±.781)
8.0	1.48 (±.142)	1.44 (±.181)	16.24 (±.763)	11.00 (±.730)	11.30 (±.625)
8.5	1.57 (±.110)	1.51 (±.126)	15.50 (±.600)	9.87 (±.736)	10.26 (±.677)
9.0	1.87 (±.112)	2.50 (±.010)	15.60 (±.345)	8.34 (±.488)	6.24 (±.538)
pH	K _m ^b (±E.S.)	K _m ^a (±E.S.)	IDH-C ₂		
			V _{max} (±E.S.)	V _{max} /K _m ^b (±E.S.)	V _{max} /K _m ^a (±E.S.)
6.5	2.85 (±.268)	3.02 (±.129)	13.21 (±.467)	4.64 (±.241)	4.37 (±.558)
7.0	2.66 (±.556)	2.62 (±.114)	13.15 (±.736)	4.94 (±.121)	5.02 (±.810)
7.4	2.52 (±.322)	2.46 (±.132)	13.76 (±.403)	5.46 (±.224)	5.59 (±.485)
8.0	2.34 (±.401)	1.97 (±.119)	13.75 (±.152)	5.88 (±.421)	6.98 (±.106)
8.5	2.35 (±.050)	1.88 (±.080)	13.14 (±.272)	5.59 (±.735)	7.00 (±.531)
9.0	2.37 (±.118)	2.81 (±.210)	13.26 (±.385)	5.59 (±.514)	4.72 (±.263)

* K_m (μm), b = ISOCITRATO, a = NADP

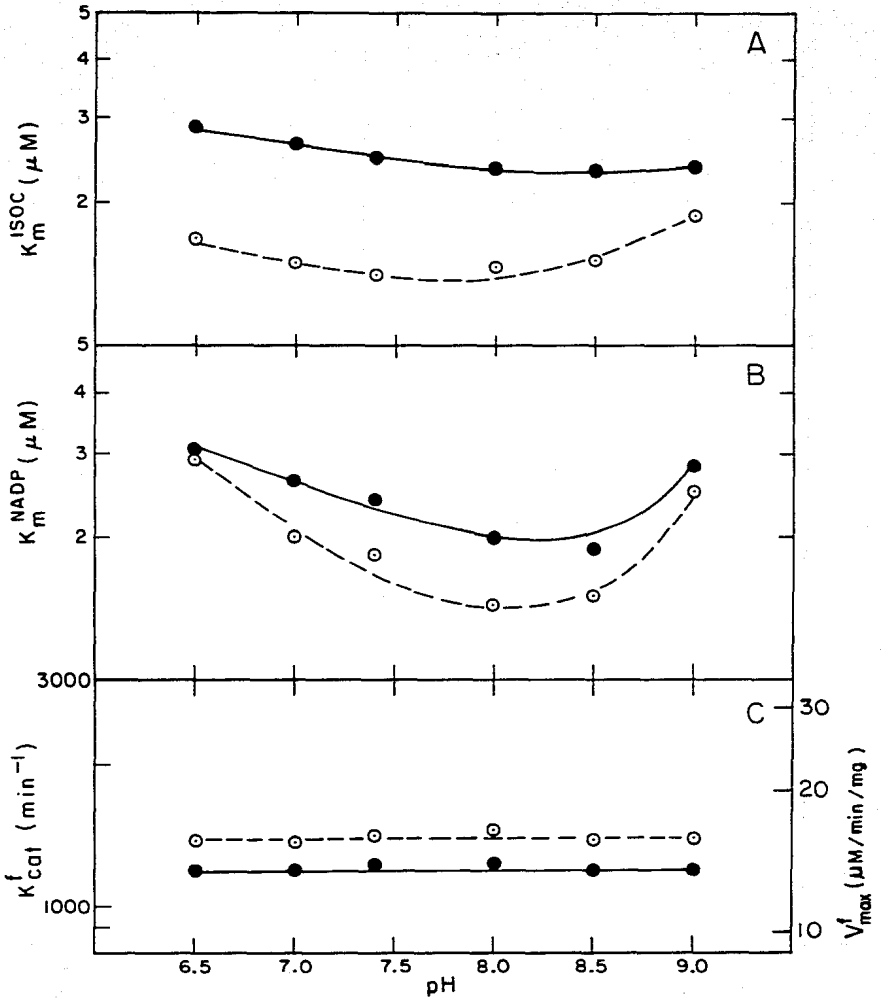
**V_{max} = (μM/min/mgP)

FIGURA 3.5 Variación de la constante de Michaelis (K_m) para isocitrato (A) y NADP (B), y variación de V^{fmax} (C) en función de pH a 25°C y fuerza iónica constante ($\mu = 0.031$).

Las condiciones experimentales están descritas en Métodos.

(O) IDH-B₂

(●) IDH-C₂



significativamente diferente ($F_{0.1\%}(1,10) = 21.04 \ll 74.64$). Las K_m para isocitrato son $1.58 \mu M \pm .067$ (S.E.) y $2.52 \mu M \pm .084$ (S.E.) para IDH-B₂ y IDH-C₂ respectivamente, a todos los pH estudiados. Mientras la tasa máxima de catálisis (V_{max}) fue independiente de pH, los valores de V_{max} fueron significativamente diferentes entre las isozimas NADP-IDH. La V_{max} para IDH-B₂ y IDH-C₂ fueron $15.60 \text{ U/mg P} \pm .158$ (S.E.) y $13.77 \text{ U/mg P} \pm .120$ (S.E.) respectivamente al nivel significativo del 0.1% ($F_{0.1\%}(1,10) = 21.04 \ll 124.22$).

Una inspección de las estimaciones de K_m^{NADP} en la Tabla 3.5 indica una dependencia de pH para ambas isozimas. Las curvas muestran una tendencia cóncava hacia arriba con un óptimo aparente entre 8.0 y 8.5 (Fig. 3.5B). Un análisis de varianza al nivel significativo de 0.1% (99.9 por ciento puntos) apoya la hipótesis de que las K_m para NADP son significativamente diferentes en función de pH, pero no diferentes entre la isozima del hígado (IDH-B₂) y del músculo (IDH-C₂). Esta dependencia de NADP con respecto al pH indica una ionización de los grupos de la enzima, los cuales controlan el enlace de la coenzima y/o posibles cambios en el estado de ionización de los grupos del NADP. Ya que la V_{max} o $k_{cat} \cdot e_0$ fue independiente de pH, la tasa constante de segundo orden V_{max}/K_m o $k_{cat} \cdot e_0/K_m$ para el isocitrato fue también independiente del pH (Fig. 3.6A). Mientras que no se

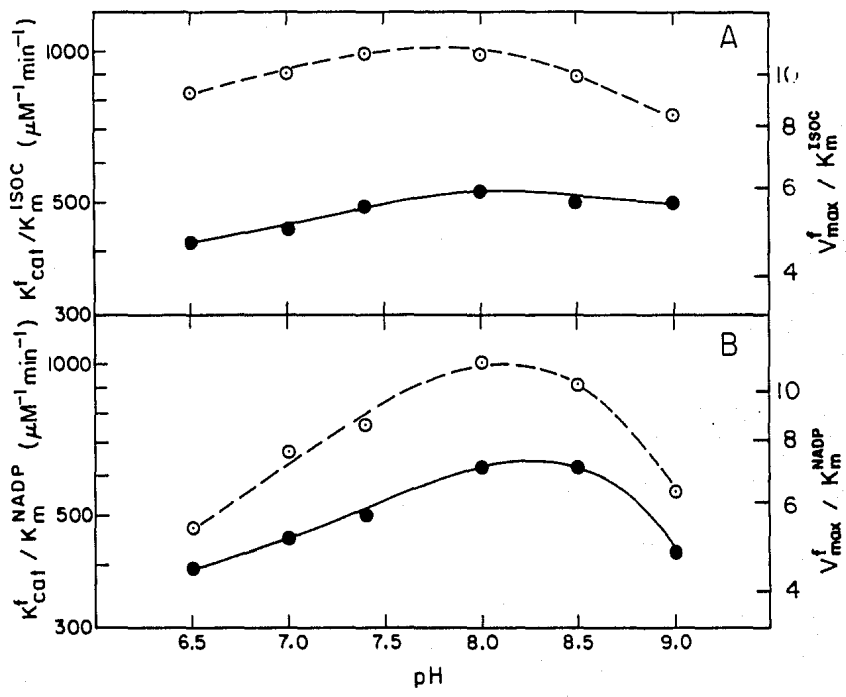
observaron diferencias significativas en los valores de V_{max}/K_m^{isoc} en función de pH para ambas isozimas, diferencias significativas fueron observadas en los valores de V_{max}/K_m^{isoc} entre las isozimas al nivel de confianza del 0.1%. En el caso de NADP, los valores de V_{max}/K_m mostraron una curva en forma de campana en ambas isozimas con un máximo a pH 8.0 para IDH-B₂ y pH 8.0- 8.5 para IDH-C₂ (Figura 3.6B). Las K_m para NADP son significativamente diferentes en función de pH en ambas isozimas al nivel de confianza del 0.1%. Pero entre ellas, la K_m de NADP y la dependencia de NADP con respecto a pH fue similar. Los valores de V_{max}/K_m^{NADP} fueron mayores para la isozima IDH-B₂ debido a una mayor tasa máxima de catálisis (V_{max}). Por lo tanto, los parámetros cinéticos en función de pH indican que IDH-B₂ tiene una mayor afinidad por el sustrato (ver Formulaciones Teóricas), y V_{max}^{f}/K_m^{isoc} (IDH-B₂) > V_{max}^{f}/K_m^{isoc} (IDH-C₂) y V_{max}^{f}/K_m^{NADP} (IDH-B₂) > V_{max}^{f}/K_m^{NADP} (IDH-C₂).

La K_m para isocitrato de F. heteroclitus no varía en gran medida entre pH 6.5 a 9.0. Estos datos concuerdan con las K_m^{isoc} de otras fuentes de NADP-IDH. En Mytilus edulis (Head y Gabbott, 1980), corazón de puerco (Colman, 1975) y glándula mamaria de bovino (Farrell, 1980), la K_m para isocitrato no varía en gran medida entre pH 6.5 a 8.9, 6.0 a 8.0 y 7.2 a 8.2 respectivamente.

FIGURA 3.6 Variación de V^f_{\max}/K_m para isocitrato (A) y NADP (B) en función de pH a 25°C. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos de las curvas de la Figura 3.5.

(○) IDH-B₂

(●) IDH-C₂



El pH óptimo para la descarboxilación oxidativa de isocitrato catalizada por NADP-IDH, varía de acuerdo a la fuente animal. Se han observado valores de 6.8 en NADP-IDH de corazón de bovino (Plaut, 1962), 7-9 en E. coli (Reeves et al, 1972), 7.4 en hígado de rata (Islam et al, 1972), 7.8 en corazón de res (Higashi et al, 1965), 8.0 en ratón (Pegoraro y Lee, 1979), y 8.5 en Drosophila (Williamson et al, 1980) y Azotobacter vinelandii (Wicken et al, 1972). El pH óptimo para la NADP-IDH de Fundulus heteroclitus es 8.0.

Estudios en diferentes sistemas enzimáticos con pH variado con temperatura han mostrado que los parámetros cinéticos difieren grandemente. Por ejemplo, los parámetros cinéticos de la enzima LDH-M₄ del pez dorado varían grandemente en función de temperatura y pH (Wilson, 1977a). Aunque la V_{max} no varió con el pH en el rango examinado, en la deshidrogenasa láctica de Carassius auratus (Wilson, 1977a) y de Fundulus heteroclitus (Place, 1979), y en la deshidrogenasa malato de F. heteroclitus (Cashon, 1981), la K_m para el sustrato incrementó con pH a todas las temperaturas examinadas en los ensayos. En la NADP-IDH de la trucha arcoiris (Moon y Hochachka, 1971a) el pH óptimo para la enzima adaptada al frío, se extiende hacia valores de pH menores a medida que la temperatura incrementa.

6. Estudios de temperatura: velocidades iniciales en función de temperatura a pH 8.0 para las isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂

Las constantes cinéticas de las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específica son resumidas en la Tabla 3.6. Estos estudios mostraron que ambos parámetros cinéticos K_m y V_{max} son dependientes de la temperatura. La K_m para isocitrato incrementa a medida que la temperatura incrementa en ambas isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂ (Figura 3.7A). Lo mismo fue observado para NADP excepto a 35°C, donde ocurrió un agudo incremento en la K_m (Figura 3.7B).

Aunque las K_m para isocitrato y las V_{max} son dependientes de temperatura, no se encontraron diferencias entre las isozimas. Un análisis de varianza falló en rechazar la hipótesis nula (H_0) a F 0.1%. Los mismos resultados fueron observados para las K_m de NADP en ambas isozimas. Por lo tanto, la respuesta a cambios de temperatura es similar en ambas isozimas IDH-B₂ y IDH-C₂.

Ya que los parámetros cinéticos varían con la temperatura, la pseudo tasa constante de primer orden V_{max}/K_m^{isoc} (i.e., cuando $isoc \ll K_m$ y e_0 no es considerada un reactante) o la tasa constante de segundo orden $k_{cat} \cdot e_0 / K_m$ (cuando la enzima es considerada como reactante) para isocitrato mostró una curva con tendencia cóncava hacia abajo con un óptimo aparente alrededor de 20°C para ambas isozimas de hígado y músculo (Figura 3.8A). Las curvas fueron estadísticamente diferentes entre las isozimas (F 0.1% (1,10) = 21.04 < 25.32).

TABLA 3.6 PARAMETROS CINETICOS PARA IDH-B₂ Y IDH-C₂
EN FUNCION DE TEMPERATURA A pH 8.0

T °C	IDH-B ₂				
	*K _m ^b (+E.S.)	K _m ^a (+E.S.)	**V _{max} (+E.S.)	V _{max} /K _m ^b (+E.S.)	V _{max} /K _m ^a (+E.S.)
10°	0.80 (+0.080)	1.27 (+0.060)	6.19 (+0.049)	7.74 (+0.787)	4.87 (+0.912)
15°	1.22 (+0.050)	1.86 (+0.110)	9.35 (+0.013)	7.66 (+0.415)	5.03 (+0.072)
20°	1.52 (+0.160)	2.25 (+0.255)	12.67 (+0.105)	8.34 (+0.817)	5.63 (+0.614)
25°	2.35 (+0.160)	2.68 (+0.086)	16.78 (+0.230)	7.14 (+0.158)	6.26 (+0.427)
30°	3.47 (+0.215)	3.33 (+0.175)	22.65 (+0.350)	6.53 (+0.212)	6.80 (+0.301)
35°	5.65 (+0.255)	7.66 (+0.145)	31.53 (+0.390)	5.58 (+0.185)	4.12 (+0.430)
T °C	IDH-C ₂				
	K _m ^b (+E.S.)	K _m ^a (+E.S.)	V _{max} (+E.S.)	V _{max} /K _m ^b (+E.S.)	V _{max} /K _m ^a (+E.S.)
10°	0.96 (+0.195)	2.02 (+0.125)	4.43 (+0.222)	4.61 (+0.056)	2.19 (+0.249)
15°	1.12 (+0.020)	2.50 (+0.262)	6.00 (+0.132)	5.36 (+0.819)	2.40 (+0.702)
20°	1.56 (+0.040)	3.25 (+0.250)	8.52 (+0.052)	5.46 (+0.114)	2.62 (+0.318)
25°	3.03 (+0.110)	4.50 (+0.229)	15.17 (+0.065)	5.01 (+0.772)	3.37 (+0.453)
30°	3.82 (+0.120)	4.73 (+0.273)	19.58 (+0.941)	5.13 (+0.979)	4.14 (+0.722)
36°	8.02 (+0.340)	12.70 (+0.200)	32.13 (+0.125)	4.01 (+0.566)	2.53 (+0.795)

* K_m (μm), b = ISOCITRATO, a = NADP

**V_{max} = (μM/min/mgP)

FIGURA 3.7 Variación de la constante de Michaelis (K_m) para isocitrato (A) y NADP (B) en función de la temperatura a pH 8.0 y fuerza iónica constante ($\mu = 0.031$).

(○) IDH-B₂

(●) IDH-C₂

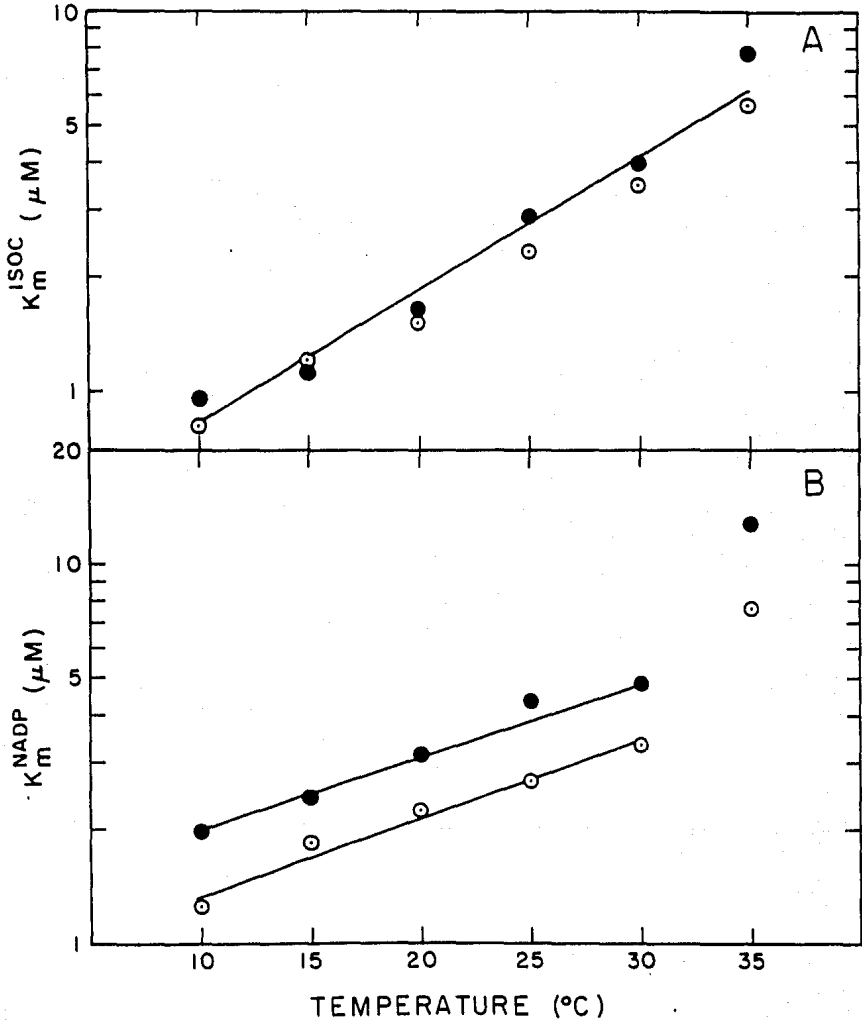
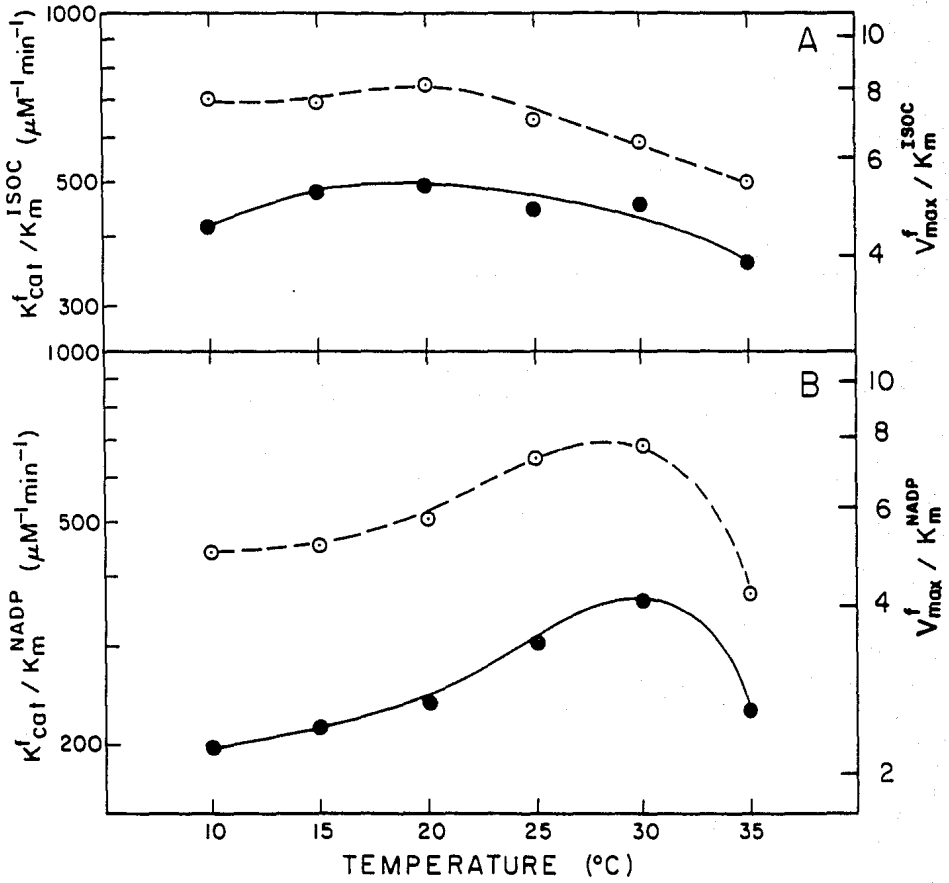


FIGURA 3.8 Variación de V_{fmax}/K_m para isocitrato (A) y NADP (B) en función de temperatura a pH 8.0. Los parámetros cinéticos V_{fmax} y K_m fueron obtenidos de las curvas de la Figura 3.7.

(○) IDH-B₂

(●) IDH-C₂



V_{max}/K_m^{NADP} (or $k_{cat}.e_0/K_m^{NADP}$) mostró una curva en forma de campana alargada hacia la izquierda con un óptimo aparente entre 25° y 30°C para ambas isozimas (Figura 3.8B). Las curvas fueron estadísticamente diferentes entre las isozimas ($F_{0.1\%}(1,10) = 21.04 < 26.52$).

En base a la suposición de que las estimaciones de K_m reflejan aproximadamente los niveles intracelulares del sustrato (Cornish-Bowden, 1976) (ver Formulaciones Teóricas), y que una alta V_{max}/K_m es el resultado de una catalisis mayor, se concluyó que la isozima IDH-B₂ es catalíticamente más eficiente que la isozima IDH-C₂ en el rango de temperatura estudiado. Es interesante hacer notar que la isozima IDH-B₂ del citoplasma del hígado mostro los más bajos valores de K_m para isocitrato y NADP en ambos estudios de temperatura y pH.

La tasa máxima de descarboxilación oxidativa de isocitrato (V^f_{max}) para las isozimas NADP-IDH mostró gráficas de Arrhenius lineales, lo cual es una buena indicación de que no ha habido cambio en el mecanismo en el rango de temperatura estudiado y de que una sola constante está manejando el proceso catalítico de la reacción en ambas isozimas (Figura 3.9). Los valores de energía de activación calculados (E_a) fueron 11 y 14 Kcal/mol para IDH-B₂ y IDH-C₂ respectivamente. La Tabla 3.7 muestra los parámetros termodinámicos de activación E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger y

FIGURA 3.9 Gráficas de Arrhenius para la tasa máxima de descarboxilación oxidativa de isocitrato (V_{fmax}). La energía de activación (E_a) fue calculada de las pendientes de las líneas. Los parametros termodinamicos ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger y ΔG^\ddagger , fueron calculados de acuerdo a Segel (1975 y 1976). El buffer utilizado fue: trietanol amina/ Cl^- pH 8.0 a fuerza iónica constante ($\mu=0.031$). Las concentraciones del buffer fueron corregidas para cada una de las temperaturas del ensayo.

(O) IDH-B₂

(●) IDH-C₂

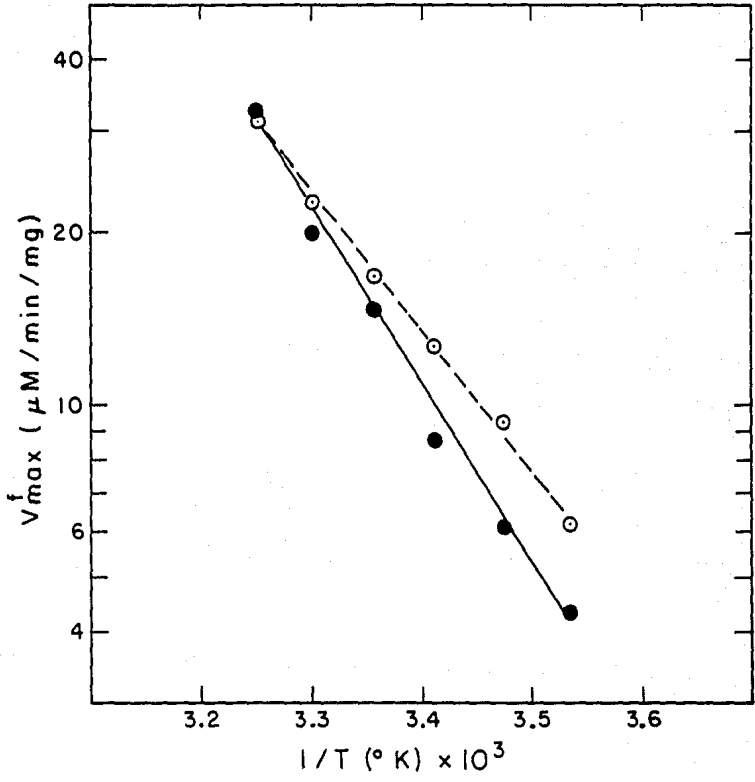


TABLA 3.7 PARAMETROS DE ACTIVACION TERMODINAMICOS DE LA
 MAXIMA DESCARBOXILACION OXIDATIVA DE ISOCITRATO (V_{max}^f)
 A pH 8.0 PARA LAS ISOZIMAS IDH-B₂ Y IDH-C₂ .

TEJIDO	HIGADO	MUSCULO	UNIDADES
ISOZIMAS	IDH-B ₂	IDH-C ₂	
E_a	11,197	14,146	CAL*/MOL
ΔH^\ddagger	10,597	13,473	CAL/MOL
ΔS^\ddagger	-17	-8	CAL/MOL°C
ΔG^\ddagger	15,722	15,827	CAL/MOL
Q_{10}	1.8	2.3	-

* 1 CALORIA = 4.19 Joules

Q_{10} calculados para ambas isozimas. Los parámetros de activación termodinámicos mostraron diferencias entre las isozimas IDH excepto en la energía libre de activación (ΔG^\ddagger), la cual es idéntica para ambas isozimas. Así, el estado de transición limitante en la oxidación de isocitrato puede ser diferente para cada isozima IDH.

La Figura 3.10A, B, C y D muestra cuatro trazos tipo Hanes-Woolf para NADP e isocitrato de ambas isozimas a diferentes temperaturas de ensayo. Esta clase de gráficos son generalmente preferidos sobre otros gráficos lineales, porque sobre un rango justo de valores de sustrato (s), los errores (no mostrados en los gráficos) en s/v proveen un reflejo justo de aquellos en v , así como, la calidad de los datos. Entonces, no existe una impresión equivocada del error experimental (i.e., pequeños errores en v llevan a enormes errores en $1/v$, y para grandes valores de v , el mismo pequeño error en v nos lleva a errores difícilmente notables en $1/v$) como sucede con los gráficos de Lineweaver-Burk.

Finalmente, se hace notar que los estudios de temperatura y pH fueron llevados a cabo con diferentes métodos (ver sección de Métodos). En los estudios de pH, los datos se colectaron a cada pH usando matrices de 5×4 . Los datos en los estudios de temperatura fueron colectados variando un sustrato mientras se mantenía el otro a niveles de saturación. Aunque los datos de ambos métodos son consistentes para

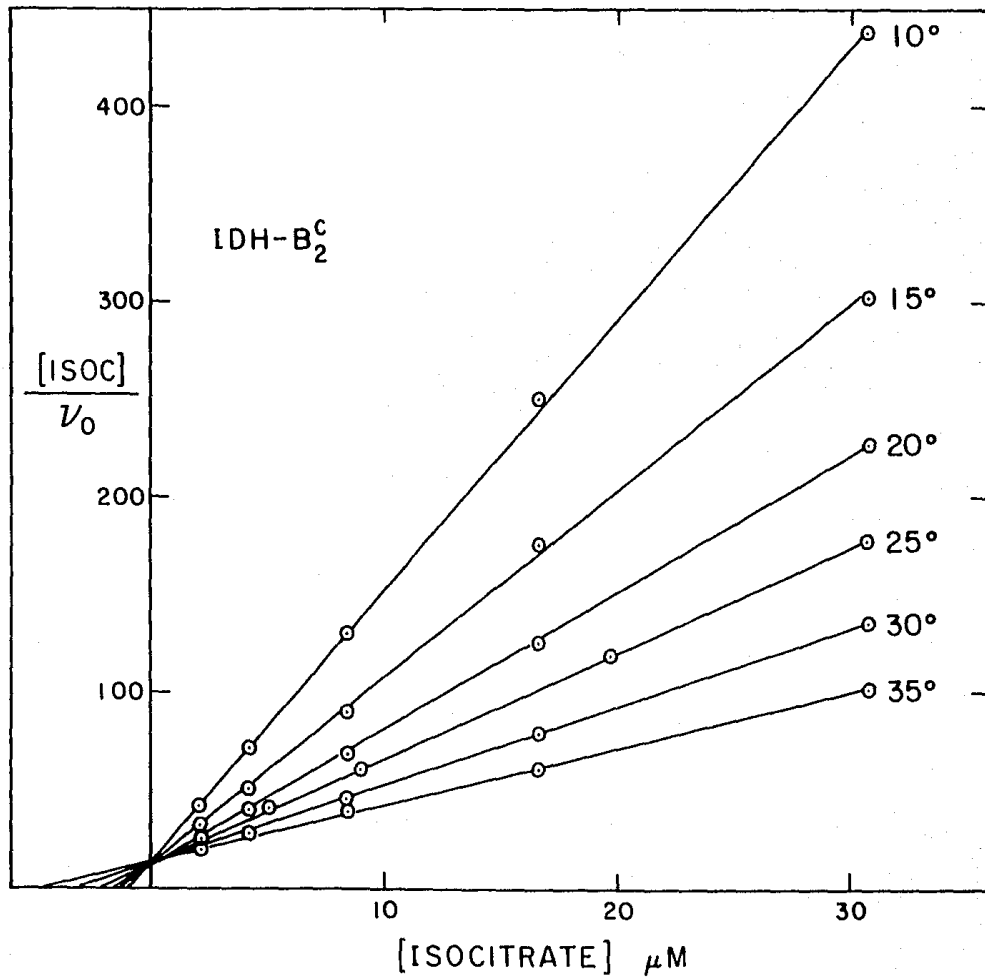
FIGURA 3.10 Gráficas tipo Hanes-Woolf a las diferentes temperaturas del ensayo. La pendiente $1/v_0^{f_{max}}$ y el intercepto $K_m/v_0^{f_{max}}$ se localizan en el eje $[S]/v_0$. El intercepto $-K_m$ se localiza en el eje $[S]$.

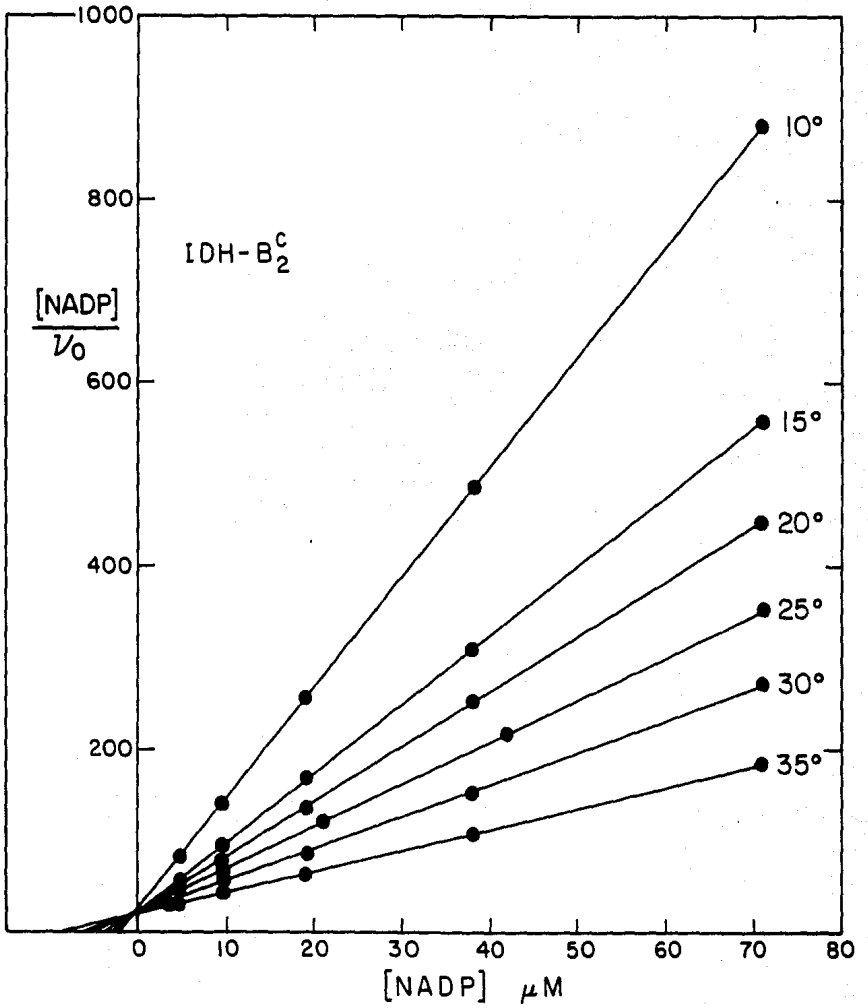
(○) IDH-B₂: $[isoc]/v_0$ versus $[isocitrato]$

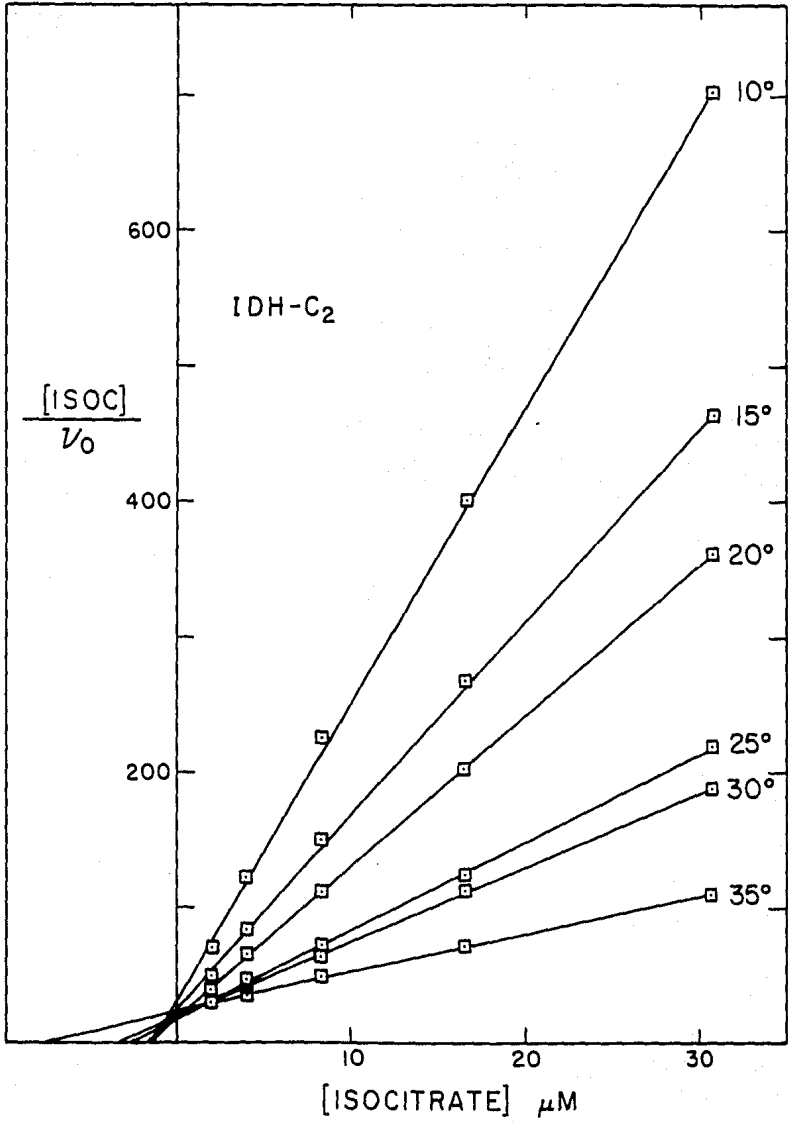
(●) IDH-B₂: $[NADP]/v_0$ versus $[NADP]$

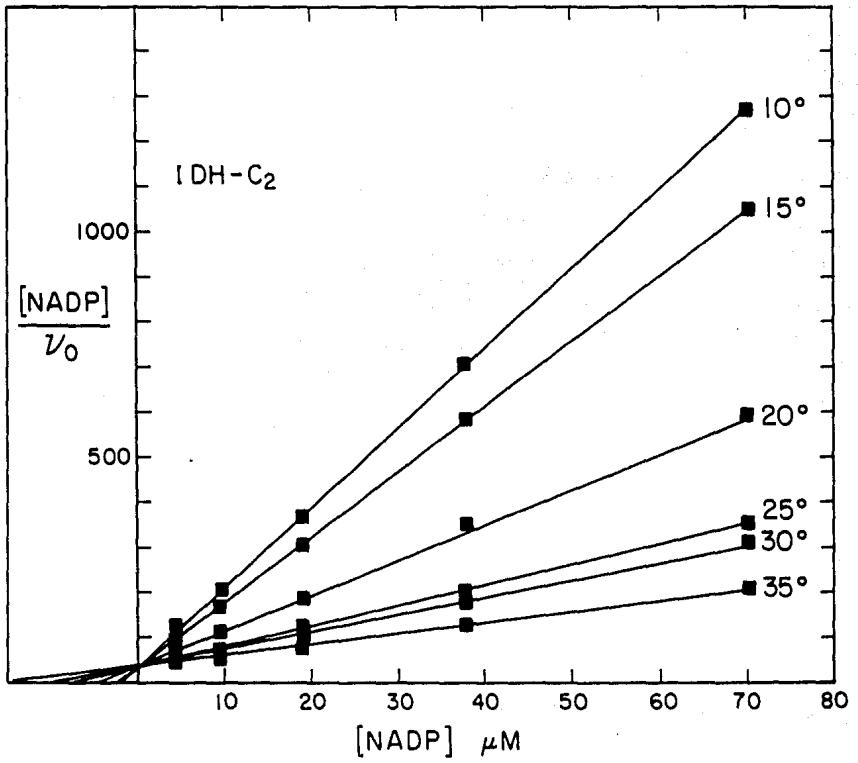
(□) IDH-C₂: $[isoc]/v_0$ versus $[isocitrato]$

(■) IDH-C₂: $[NADP]/v_0$ versus $[NADP]$









comparaciones entre isozimas, los valores de K_m y V_{max} fueron ligeramente más pequeños por el método de matrices, que los obtenidos por el método de una sola variable.

H. DISCUSION

1. Estudios de pH:

Los estados de ionización de los sustratos y de amino ácidos en las enzimas puede afectar las tasas de las reacciones catalizadas. Cambios en el pH pueden dramáticamente afectar los parámetros cinéticos como V_{max} y K_m (Roberts, 1977).

Un cambio en el pH puede afectar el sitio activo de la enzima o el estado de ionización del sustrato, alterando de ese modo la afinidad enzima-sustrato. Por ejemplo, V_{max} de la reacción derecha e inversa de la NADP-IDH de Azotobacter vinelandii es dependiente de pH (Wicken et al, 1972). Esto es atribuido a grupos disociadores de protones en el complejo enzima-sustrato. En la NADP-IDH de corazón de puerco (Ehrlich y Colman, 1976) y corazón humano (Seelig y Colman, 1978), la V_{max} es también dependiente de pH. Tal dependencia se atribuye a la ionización de un amino ácido carboxílico individual en el complejo enzima-sustrato. Si existen grupos ionizables en la enzima libre (i.e, IDH) o el sustrato (isocitrato o NADP), la K_m debe incrementar en ambos lados del pH óptimo y la V_{max} no debe ser afectada (Roberts, 1977). Ya que la K_m^{NADP} de la IDH de Fundulus heteroclitus se comporta de tal forma (Figura 3.5B), se concluyó que existen grupos ionizables en el NADP y/o la enzima libre que afectan

el enlace de NADP. Ionización del complejo enzima- sustrato y/o la enzima libre no es apremiante porque ambas V_{max} y $K_{m\text{isoc}}$ son independientes de pH. Ya que ellas no son afectadas por cambios de pH (Figuras 3.5A y C), se concluyó que cualquier de los grupos en la enzima o el isocitrato, no afecta la afinidad de la enzima-sustrato o el efecto es complementario y opuesto, i.e. no hay efecto neto de pH. Por ejemplo, una combinación de un grupo de la enzima cargado negativamente, con un grupo del sustrato cargado positivamente, no altera la carga total (carga neta cero) al enlazarse el sustrato con la enzima en un cierto rango de pH. Esta conducta ha sido observada en la enzima arginasa (Dixon, 1953).

Con las suposiciones y reservas establecidas previamente (ver Formulaciones Teóricas), la tasa constante que está siendo afectada por el pH, es la constante del enlace del NADP (k_1) porque $V_{fmax}/K_{m\text{NADP}} = k_1 \cdot e_0$. Por otro lado, k_{-2} , k_2 , k_3 , k_4 y k_5 no son afectadas por pH, o los efectos de una constante son compensados por el cambio opuesto y complementario de otra.

2. Estudios de temperatura:

Los complejos enzima-sustrato pueden ser ya sea estabilizados o mas lábiles a medida que la temperatura disminuye. En el primer caso, el complejo E-S a menudo depende de interacciones iónicas, mientras que en el segundo caso las

interacciones hidrofóbicas predominan (Hochachka y Somero, 1973). Ya que la afinidad del isocitrato incrementa a medida que la temperatura es disminuida, el complejo NADP-IDH-isocitrato puede parcialmente depender de interacciones iónicas.

Las enzimas que tienen formas específicas estacionales, como en la NADP-IDH de la trucha arcoiris (Moon y Hochachka, 1971a), muestran cambios agudos relativos en la afinidad enzima-sustrato con temperatura. Como se observó una dependencia a temperatura de K_m^{isoc} , es razonable suponer que las diferentes isozimas NADP-IDH pueden asegurar relaciones de afinidad compensatorias a cambios de temperatura. Ya que F. heteroclitus está sujeto a temperaturas entre 4° y 35°C (Nixon y Oviatt, 1973), los beneficios de las tasas de compensación de IDH son obvios. Correlaciones entre K_m y la temperatura del ensayo han sugerido que las variaciones en K_m son debidas a compensaciones térmicas a corto-plazo de las tasas metabólicas (Somero, 1978). Sin embargo, esta compensación a corto-plazo no puede ser significativa si las concentraciones de sustrato incrementan a la misma tasa que K_m (Somero, 1978).

La correlación observada entre la temperatura y la K_m^{isoc} en mis estudios, considera tasas de catálisis a concentraciones de sustrato no saturadas. Si las concentraciones de sustrato están mucho más abajo que la K_m de la enzima

(Ferhst, 1977), la tasa es proporcional a V_{max}/K_m (i.e., la pseudo tasa constante de primer orden cuando $S \ll K_m$). V_{max}/K_m refleja la habilidad de la enzima y el sustrato para formar el complejo (Cleland, 1970), fijando un límite más bajo en la tasa constante para la asociación de enzima y el sustrato. V_{max}/K_m no puede ser más grande que cualquier tasa constante de segundo orden en la reacción hacia la derecha (Ferhst, 1977).

Los dos parámetros V_{max} y K_m se sabe que son parcialmente "ajustables" en respuesta a eventos fisiológicos sobre una escala de tiempo corta (Hochachka y Somero, 1973). Tal ajuste no sólo ha sido enfocado hacia adaptaciones ambientales a corto plazo (Somero, 1978), sino también es una vía de adaptación a las condiciones impuestas por el medio ambiente sobre tiempo evolutivo (Crowley, 1975; Cornish-Bowden, 1976). Por ejemplo, Crowley (1975) asegura que el efecto probable de presión evolutiva debe ser incrementar ambas V_{max} (o $k_{cat} \cdot e_0$) y K_m y que el logro de altas tasa para la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas del metabolismo intermediario parece ser un objetivo evolutivo primario (Cornish-Bowden, 1976). Diferencias en V_{max}/K_m entre enzimas homólogas sujetas a diferentes presiones ambientales han sido observadas (Borgmann y Moon, 1975; Place y Powers, 1979).

Diferencias en termoestabilidad han sido mostradas en enzimas homólogas (Place, 1979; Cashon, 1981). El grado de

grado de termoestabilidad de las enzimas de los peces ha sido también correlacionado con la temperatura ambiental del organismo (Kusakina y Vinogradova, 1967; Johnston y Walesby, 1977), y a diferencias en el medio ambiente físico de la molécula de proteína, incluyendo el pH y la viscosidad (Ikeuchi et al, 1981). La eficiencia catalítica y la estabilidad al calor son recíprocamente relacionadas (Somero, 1975b) y la estabilidad al calor muestra una variación regular con la temperatura de adaptación (Low y Somero, 1976; Somero, 1978). En mis estudios, se encontraron diferencias significativas en la estabilidad al calor entre las isozimas IDH. La isozima IDH-B₂ mostró una termoestabilidad y eficiencia catalítica mayor que la isozima IDH-C₂ (Capítulo II). Ya que las isozimas tienen propiedades únicas, probablemente existe para cada una de ellas una diferente relación estructura-función.

Bajo condiciones de saturación de sustrato y cofactor, los efectos sobre reacciones catalizadas por enzimas dependen de la energía libre de activación ΔG^\ddagger . Una reducción de ΔG^\ddagger para las reacciones de enzimas homólogos debe ser esperada como una estrategia compensatoria de adaptación (Hochachka, 1973). Un valor bajo de ΔG^\ddagger para una reacción dada, indica un catalizador altamente eficiente y consecuentemente menos dependiente de temperatura. A bajas temperaturas de adaptación, las reacciones de catálisis

mostrarán un Q_{10} más bajo (dependencia térmica reducida) y una alta constante catalítica, i.e. k_{cat} . Las consecuencias termodinámicas de cambios en la temperatura externa son características de los poikiloterms y han sido encontradas en muchos sistemas de enzimas diferentes en ectoterms en comparación con homeoterms (Low y Somero, 1974; Low et al., 1973). Diferencias en la magnitud de los parámetros termodinámicos de activación pueden ser explicadas en base a un incremento en la formación de enlaces débiles durante la generación del complejo E-S en los sistemas ectotérmicos. Las energías libres de activación (ΔG^\ddagger) del complejo activado son muy similares, y covariación en ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger está siempre presente (Somero, 1978). En adición, se ha afirmado que durante el paso de activación en catálisis la enzima de un animal de sangre fría forma mas enlaces de hidrógeno (Somero, 1978).

Las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus exhiben diferencias en Q_{10} , E_a , ΔH^\ddagger , y ΔS^\ddagger (Tabla 3.7), pero tienen idénticas energías libres de activación (ΔG^\ddagger). Los parámetros de activación termodinámicos para IDH-B₂ fueron menores que los respectivos de IDH-C₂. Estos hallazgos son consistentes con una tasa catalítica mayor para IDH-B₂, que pueden estar relacionados con la adaptación enzimática específica de tejido a la temperatura. En conclusión, las isozimas NADP-IDH muestran diferencias en

termoestabilidad, constantes cinéticas y parámetros termodinámicos de activación, como es el caso de otros poikiloterms. Ya que las isozimas NADP-IDH muestran diferencias en termoestabilidad, propiedades cinéticas y sensibilidad a la temperatura, cualquier cambio en el régimen térmico del pez puede afectar la tasa catalítica y regulación metabólica. Así, compensaciones térmicas pueden ser logradas, en parte, a través de variaciones en (i) K_m y k_{cat} ; (ii) la energía de activación (E_a); y (iii) a través de variaciones en la entalpía y entropía de activación de la reacción catalizada.

3. Posibles papeles fisiológicos de las isozimas NADP-IDH de *Fundulus heteroclitus*:

A. Papel de las isozimas IDH en el músculo blanco:

Aunque todos los músculos de vertebrados muestran ambas actividades glicolítica y respiratoria, la contribución relativa de ambas a la producción de energía varía considerablemente (Lehninger, 1977). En el músculo blanco del pez, glicólisis es la principal fuente de energía para la re-fosforilación de ADP. Durante actividad muscular máxima, el ATP se convierte en ADP, y mientras la tasa de consumo de oxígeno incrementa, el metabolismo anaeróbico es favorecido sobre el aeróbico. El exceso de lactato es liberado dentro de la sangre y convertido nuevamente en glucosa en el hígado. En el músculo en descanso, glicólisis es menos favorecida.

Ya que la NAD-IDH está también presente en el músculo blanco de F. heteroclitus, uno se pregunta porqué la mitocondria requiere de ambas isozimas NADP-IDH y NAD-IDH. Varios parámetros pueden diferencialmente afectar estas isozimas IDH mitocondriales. Las variaciones en pH pueden alterar la razón NADH/NADPH y favorecer una de las isozimas IDH (Colman, 1975; Ingebretsen y Sanner, 1976). Siebert et al (1957a) han mostrado que la reacción en equilibrio es cambiada hacia la oxidación del cofactor a medida que el pH disminuye. El pH intracelular de los poikilotermos, como Fundulus, cambia en función de la temperatura (Wilson, 1977a y b). En adición, altos flujos metabólicos también reducen el pH debido a la generación de ácidos metabólicos (ácido láctico, ácido carbónico, etc.) (Johnston, 1977; Thillart et al, 1982). Por ejemplo, en el músculo de la carpa un alto flujo metabólico incrementa la concentración de lactato ocasionando una caída del pH intracelular (Johnston, 1977). Períodos cortos de natación en los salmones resultan en la producción de grandes cantidades de ácido láctico, el cual reduce el pH de la sangre (Black et al, 1966). Estos mismos resultados han sido encontrados en Fundulus heteroclitus durante experimentos de resistencia a natación (DiMichele y Powers, 1982b).

La isozima NADP-IDH (IDH-C₂) del músculo blanco de Fundulus está presente en altas concentraciones y su

actividad es alta comparada con la enzima NAD-IDH que es inestable. Ya que la K_m^{NADP} de la IDH-C₂ es dependiente de pH, la contribución de esta enzima a la producción de energía puede ser regulada por cambios en la concentración intracelular de protones. Un cambio en el pH intracelular, producido ya sea por cambios de temperatura o por flujos metabólicos, afectará la afinidad de NADP por la isoforma IDH-C₂, y así afectará el flujo de la descarboxilación oxidativa de isocitrato.

Durante la actividad muscular, energía y oxígeno serán consumidos. Ya que la producción de energía es requerida para mantener tal actividad, el isocitrato será oxidado vía NADP-IDH mitocondrial para generar NADPH el cual, acoplado a un sistema de transhidrogenación (Kaplan, 1972), generará NADH para la refosforilación de ADP. Como la actividad muscular continúa, lactato y otros ácidos catabólicos bajarán el pH intracelular y favorecerán la carboxilación reductiva (reacción inversa) porque la afinidad de NADP esta directamente relacionada al pH entre pH 6.5 y 8.0 (Figura 3.6B).

Debido a que la producción de NADPH disminuye y el ATP es consumido, la razón ATP/ADP disminuirá. Un incremento en ADP estimulará a la enzima NAD-IDH, la cual incrementará la producción de NADH y por consecuencia la de ATP. Cuando la actividad muscular es disminuida, la concentración de ATP

incrementará e inhibirá a la enzima NAD-IDH (Atkinson, 1977). El descanso muscular también elimina el lactato del músculo, ocasionando que el pH intracelular incremente y favorezca la oxidación de isocitrato vía isozima NADP-IDH. Por lo tanto, la mitocondria del músculo depende de ambas NADP-IDH y NAD-IDH para la producción de energía durante varios niveles de actividad muscular.

Aunque este escenario es consistente con nuestros datos de cinética enzimática, posteriores estudios con la enzima NAD-IDH considerando el pH deben ser llevados a cabo para determinar la dependencia al pH de la enzima NAD-IDH.

B. Papel de las Isozimas IDH en el Hígado:

En el hígado una situación más compleja es presente porque hay tres enzimas IDH: La isozima citoplásmica NADP específica (IDH-B₂) y dos formas mitocondriales: la isozima IDH-A₂ que es NADP específica y la enzima NAD-IDH.

IDH-A₂ y IDH-B₂ exhiben diferentes V_{max}, siendo mayor la de IDH-B₂ que la de IDH-A₂. Sin embargo, como la $V_{max} = k_{cat} \cdot [e_0]$, uno no puede eliminar la posibilidad de que una pequeña diferencia en pureza (o menos enzima activa) pudiera responder por estas diferencias en V_fmax. Los estudios cinéticos fueron llevados a cabo con enzimas de pureza similar, y no se observó disminución en la actividad enzimática durante los ensayos. Por lo tanto, sospechamos que

las diferencias observadas en V_{max} resultan de diferencia intrínsecas en k_{cat} . Sin embargo, estudios futuros sobre titulación del sitio activo de NADP-IDH deben ser realizados para clarificar este punto importante.

Mientras que la IDH-A₂ y IDH-B₂ tienen idénticas K_m^{isoc} , IDH-B₂ tiene una menor K_m para NADP. Por lo tanto, aun si las V_{fmax} son iguales, V_{fmax}/K_m^{NADP} será diferente entre la IDH-A₂ y la IDH-B₂. Entonces, la constante de enlace (k_1) de NADP todavía diferiría entre las isozimas IDH de la mitocondria y citoplasma del hígado. Si las V_{max} son iguales, la NADP-IDH citoplásmica (IDH-B₂) aún tendría una constante de enlace para NADP mas pequeña con respecto a la isozima mitocondrial (IDH-A₂). Como ambas isozimas NADP-IDH tienen afinidades similares para el isocitrato, las diferencias en K_m^{NADP} favorecerán el transporte de NADPH dentro de la mitocondria de acuerdo al esquema ilustrado en la Figura 3.11. Este sistema de transporte citoplasma-mitocondria (Kaplan, 1972; Newsholme y Start, 1973) puede también servir como una fuente importante de NADPH extramitocondrial para la biosíntesis citoplásmica (Lowenstein, 1961; Pette, 1966), porque la NADP-IDH citoplásmica mantiene una alta razón NADPH/NADP (Lowenstein, 1961).

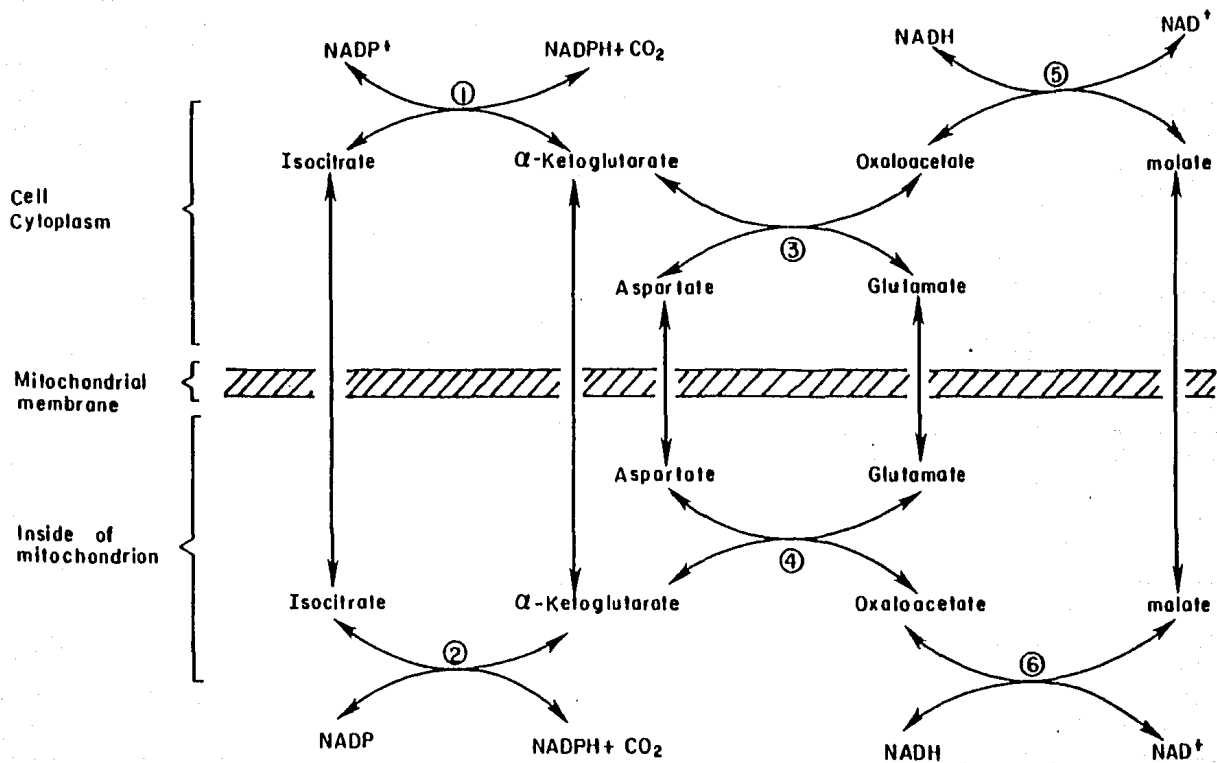
La NAD-IDH es una enzima aloésterica (Atkinson, 1977) y es un catalizador en un sentido (Newsholme y Start, 1973).

FIGURA 3.11 Transporte malato-isocitrato a través de la mitocondria y citoplasma ilustrando el papel de las isozimas deshidrogenasa isocítrica NADP específicas. Las enzimas que participan en este transporte son numeradas de 1 a 6 y son las siguientes: IDH-B₂, IDH-A₂, AAT-B₂, AAT-A₂, MDH-A₂ y MDH-C₂ respectivamente. Todas las enzimas son polimórficas excepto MDH-C₂.

IDH = deshidrogenasa isocítrica

AAT = Aspartato amino transferasa

MDH = Deshidrogenasa malato

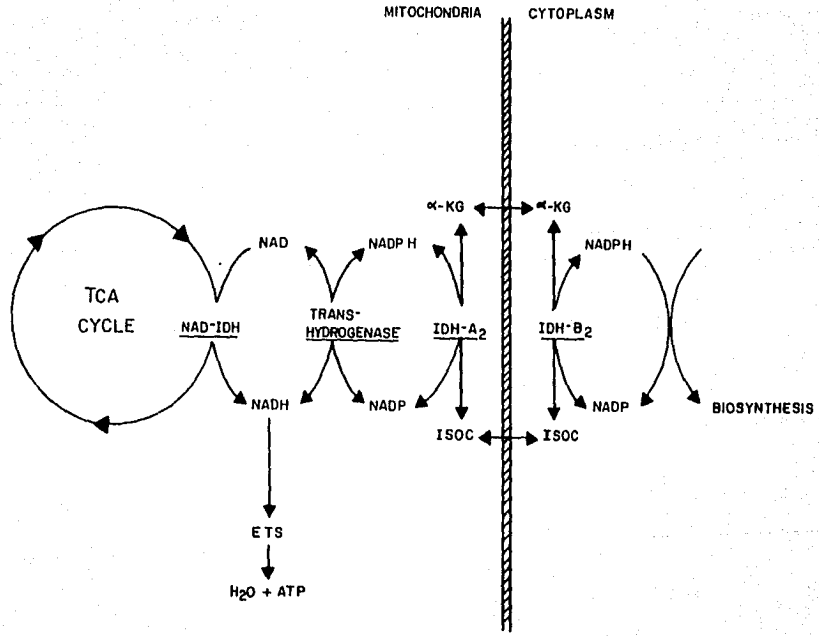


Colman (1975) ha mostrado que la K_m^{isoc} de la NAD-IDH de corazón de puerco es dependiente de pH, y de acuerdo a Colman: "la NAD-IDH y la NADP-IDH se complementan. Varios factores, junto con sutiles variaciones de pH, influyen el flujo relativo a través de dos vías de descarboxilación oxidativa de isocitrato. Estos cambios pueden contribuir a una alteración en la razón NADPH a NADH en el medio ambiente intacelular". Ya que (i) bajas cantidades de NAD-IDH fueron encontradas en el hígado de F. heteroclitus, (ii) un sistema de transhidrogenación está ligado cercanamente a la enzima mitocondrial NADP-IDH (Kaplan, 1972), y (iii) una concentración substancial de transhidrogenasa ha sido correlacionada con altos niveles de NADP-IDH (Stein et al, 1967), dos vías para la oxidación de isocitrato pueden existir en la mitocondria del hígado de Fundulus. Una vía puede ser controlada por la isozima mitocondrial NADP-IDH acoplada al sistema de transhidrogenación y otra por la enzima NAD-IDH. La Figura 3.12 ilustra una posible vía metabólica para la oxidación de isocitrato por las isozimas IDH del hígado de Fundulus heteroclitus.

Fundulus heteroclitus mantiene un equilibrio durante los ciclos de alimentación-ayuno y ejercicio-descanso. Los procesos de catabolismo y anabolismo operan de acuerdo a los requerimientos fisiológicos del animal. La actividad de NAD-IDH es gobernada por Mn^{2+} , isocitrato, NAD, NADH, y

FIGURA 3.12 Esquema de una posible vía de oxidación de isocitrato por las isozimas NADP específicas citoplásmica (IDH-B₂) y mitocondrial (IDH-A₂), y la enzima mitocondrial NAD-IDH en el hígado de Fundulus heteroclitus. La Figura ilustra la generación de NADPH para los procesos de biosíntesis y el posible acoplamiento de NADPH a un sistema de transhidrogenación para generar junto con la enzima NAD-IDH, equivalentes reductores para la producción de energía (ATP) en el sistema de transporte de electrones (cadena respiratoria).

LIVER



AMP. Ya que la enzima tiene efectores positivos y negativos, su tasa de reacción es determinada por las razones NAD/NADH y ADP/ATP.

Después de ingerir alimento y en condiciones de descanso, los combustibles ingeridos son convertidos en glucosa, ácidos grasos, amino ácidos y triglicéridos. En el hígado, el combustible es grandemente almacenado como glicógeno y triglicéridos. Los procesos biosintéticos requieren de NADPH que puede ser suministrado por la vía del fosfogluconato, la deshidrogenasa málica, la deshidrogenasa isocítrica NADP específica del citoplasma, etc. (White et al, 1978). No importa cual es la fuente de NADPH, éste puede ser usado en la síntesis de ácidos grasos, síntesis de esteroides, generación de polioles, interconversión de deoxihexosas, degradación de lisina, triptofano, tímína y citosina, síntesis de vitamina A, como fuente del mecanismo de transhidrogenación y para reducir metahemoglobina, glutatión y tioredoxina. Todos estos procesos biosintéticos son favorecidos en un pez bien alimentado y en descanso.

Durante ayuno, las reservas de glicógeno del hígado son usadas en la glicólisis anaeróbica, por las células sanguíneas, el músculo blanco y la continua oxidación por el cerebro y el sistema nervioso. Las principales vías metabólicas operando en estas condiciones en el hígado son la catálisis de triglicéridos, oxidación de ácidos grasos y

gluconeogénesis de los amino ácidos, lactato y glicerol, los cuales son suministrados por el músculo, nervios, cerebro, células sanguíneas y tejido adiposo. El hígado a la vez suministra de glucosa a esos tejidos vía gluconeogénesis.

Durante ejercicio extremo este fenómeno es acentuado; los triglicéridos y glicógeno del hígado se desdoblán liberando ácidos grasos y glucosa, respectivamente, dentro de la sangre. Estos metabolitos a la vez serán oxidados por el músculo para generar ATP. El lactato generado durante la contracción muscular es regresado al hígado y convertido nuevamente a glucosa vía gluconeogénesis. El ejercicio incrementa la cantidad de lactato y disminuye el pH de la sangre de Fundulus (DiMichele y Powers, 1982a), así como una disminución del pH intracelular (Johnston, 1977; Thillart et al, 1982). Estos cambios en pH pueden contribuir a la regulación metabólica de las isozimas IDH porque cambios en la concentración mitocondrial de la razón NADH/NAD son un importante vínculo entre las vías oxidativas y la respiración (Denton y Pogson, 1976). La K_m^{isoc} de la NAD-IDH de corazón de puerco es dependiente de pH, y sutiles variaciones de pH pueden contribuir a una alteración en la razón NADPH a NADH, favoreciendo a la enzima NADP-IDH o a la NAD-IDH (Colman, 1975). Una disminución en pH también favorece la carboxilación reductiva de α -cetoglutarato (Siebert et al, 1957a). Además, esta tesis ha mostrado que la afinidad

de NADP de la isozima IDH-B₂ de Fundulus es también dependiente de pH.

Aunque los datos de cinética enzimática son consistentes con el razonamiento descrito en esta tesis y con los estudios de las isozimas deshidrogenasa malato de Fundulus (Cashon, 1981), no conocemos la concentración de los sustratos intracelulares, pH, ni la razón NADPH/NADP. Estos parámetros importantes deben ser obtenidos y posteriores estudios hechos, con objeto de determinar si los experimentos "in vitro" son verdaderamente reflejados "in vivo".

APENDICE I

APENDICE I

A. ECUACION PARA LA CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA.

Un ajuste razonable de los datos, a un proceso diferente al lineal simple de primer orden, fue logrado por medio de la siguiente ecuación:

$$V/V_0 = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} \quad [\text{ec. 1}]$$

donde V = actividad de la enzima al tiempo t , V_0 = actividad inicial de la enzima, C_1 y C_2 son constantes en función de las constantes k_1 y k_2 de la tasa de reacción de primer orden. Las Figuras A.1 a A.9 muestran los perfiles de desnaturalización y la Tabla A.1, los ajustes obtenidos por computación de los datos de desnaturalización térmica (ver en Capítulo II la conducta de las isozimas IDH durante inactivación térmica). Los siguientes supuestos fueron considerados con objeto de justificar el uso de la ecuación 1 para ajustar los datos.

La conformación de las proteínas es dependiente de temperatura, y cambios en la estructura cuaternaria y terciaria pueden ocurrir. Las interacciones hidrofóbicas junto con otros enlaces químicos débiles, contribuyen a la estabilidad de las estructuras cuaternaria y terciaria de las enzimas multiméricas, así manteniendo la asociación de las subunidades. Los enlaces químicos débiles pueden ser rotos por medio de energía térmica pero la pérdida de la estructura

TABLA A-1 AJUSTE DE LOS DATOS DE DESNATURALIZACION
TERMICA POR COMPUTACION.

ISOZIMA	CONDI- CIONES °C	C ₁	k ₁	C ₂	k ₂	RAIZ CUADRADA DE LA VARIANZA
IDH-A ₂	50°	*.84438	-.07122	.03357	.00320	3.42 x 10 ⁻²
		.90279	-.06427	.07800	.01525	
		** .94451	-.05729	.14020	.02592	
IDH-B ₂	50°	.87550	-.02053	.06433	.01649	1.57 x 10 ⁻²
		.91198	-.01877	.09821	.02108	
		.94451	-.01717	.13620	.02577	
IDH-C ₂	37°	.27618	-.17758	.57710	-.01225	2.85 x 10 ⁻²
		.35333	-.13556	.65082	-.00969	
		.42477	-.09666	.73044	-.00732	
IDH-C ₂	40°	.40103	-.23411	.40990	-.02319	2.83 x 10 ⁻²
		.49577	-.18310	.50063	-.01843	
		.58509	-.13501	.59686	-.01395	
IDH-C ₂	42°	.66392	-.26338	.21755	-.02355	1.68 x 10 ⁻²
		.72404	-.22808	.27420	-.01757	
		.78090	-.19469	.33409	-.01192	
IDH-C ₂	43°	.62680	-.69636	.29148	-.05702	1.38 x 10 ⁻²
		.67333	-.56566	.32667	-.04951	
		.70922	-.46483	.37228	-.04372	
IDH-C ₂	45°	.70379	-.79565	.17896	-.08500	2.22 x 10 ⁻²
		.77244	-.61509	.22757	-.06572	
		.82147	-.48612	.29561	-.05195	
IDH-C ₂	45° W/NADP	.37085	-.22451	.50686	-.17747	1.89 x 10 ⁻²
		.43048	-.18478	.56738	-.15177	
		.49011	-.14505	.62789	-.12608	
IDH-C ₂	45° W/ISOC	.20070	-.16834	.72775	-.00467	1.39 x 10 ⁻²
		.23509	-.13627	.76566	-.00373	
		.27170	-.10213	.80127	-.00272	

* Limite inferior

** Limite superior

FIGURAS A1 a A9. Ilustran la cinética de desnaturalización térmica para cada una de las isozimas NADP-IDH de Fundulus heteroclitus, que fueron obtenidas por computación del ajuste de los datos a la ecuación:

$$V/V_0 = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t}$$

En cada una de las figuras se indica la isozima y la temperatura a la que fue incubada. En todos los casos se utilizó el buffer: trietanol amina/ Cl^- 30 mM pH 7.4 conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 1%.

Los detalles experimentales se encuentran descritos en el Capítulo II, sección 15.

A1. IDH-A₂ incubada a 50°C

A2. IDH-B₂ incubada a 50°C

A3. IDH-C₂ incubada a 37°C

A4. IDH-C₂ incubada a 40°C

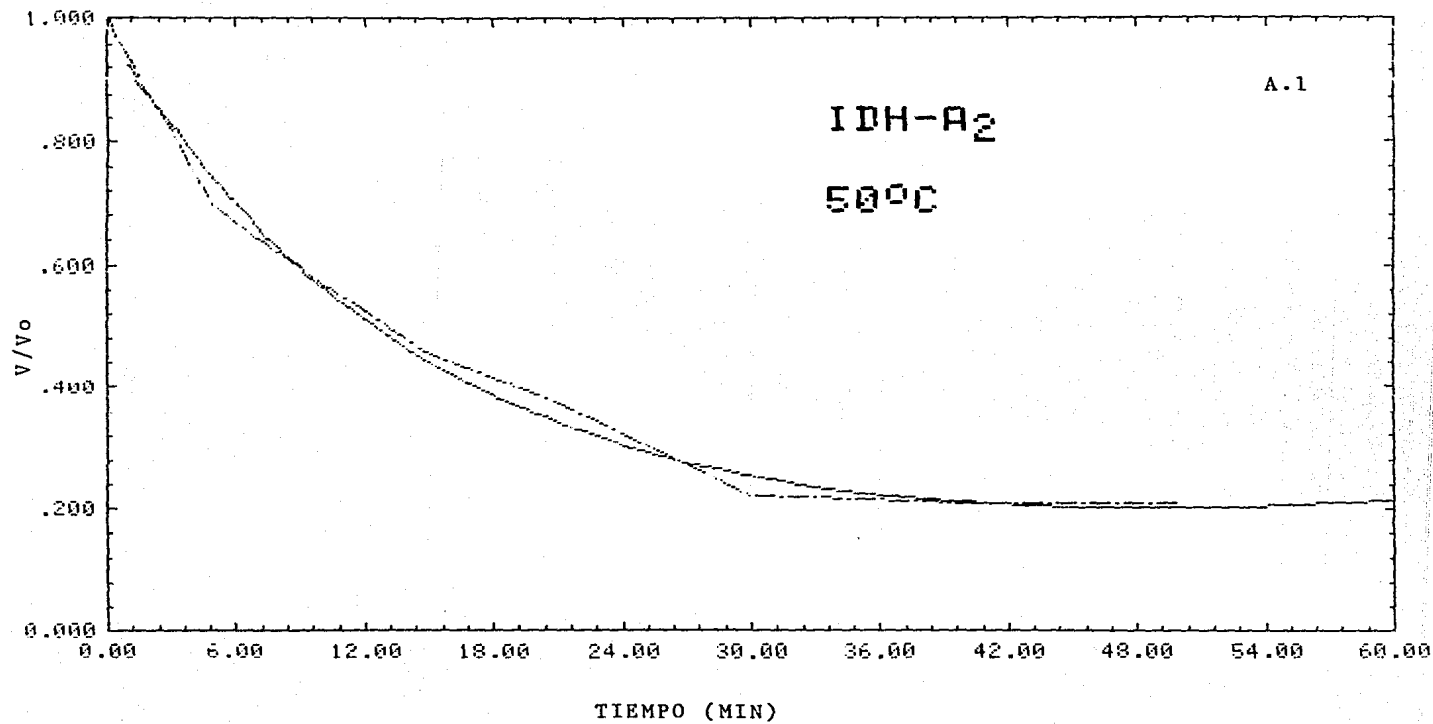
A5. IDH-C₂ incubada a 42°C

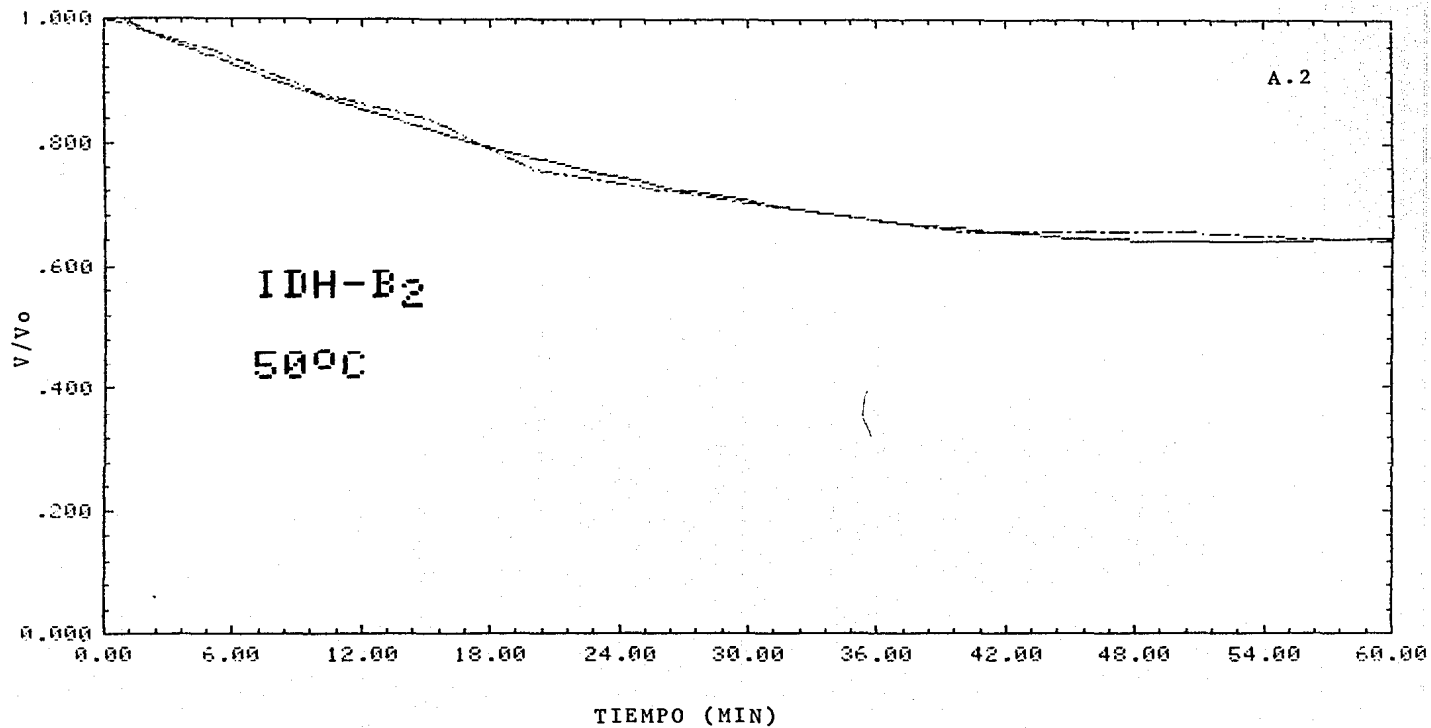
A.6 IDH-C₂ incubada a 43°C

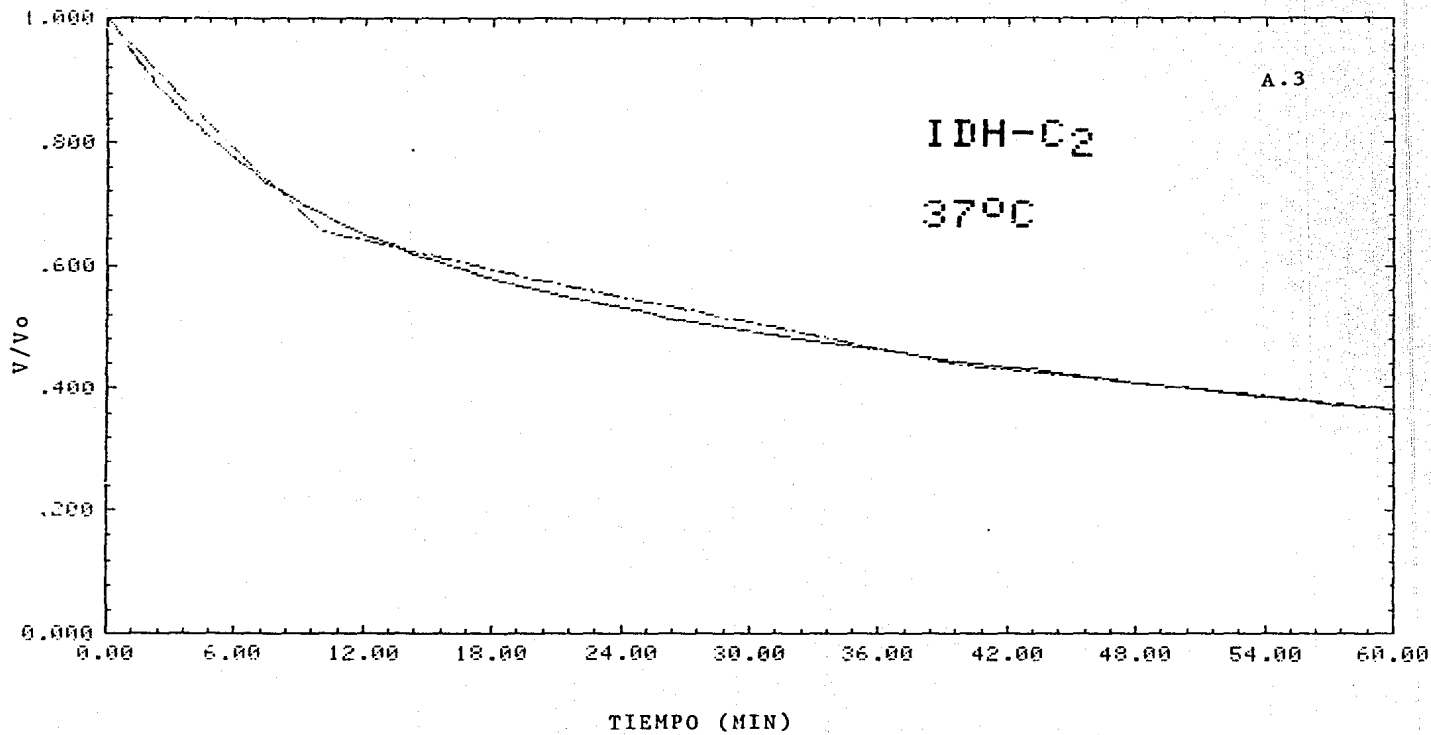
A.7 IDH-C₂ incubada a 45°C

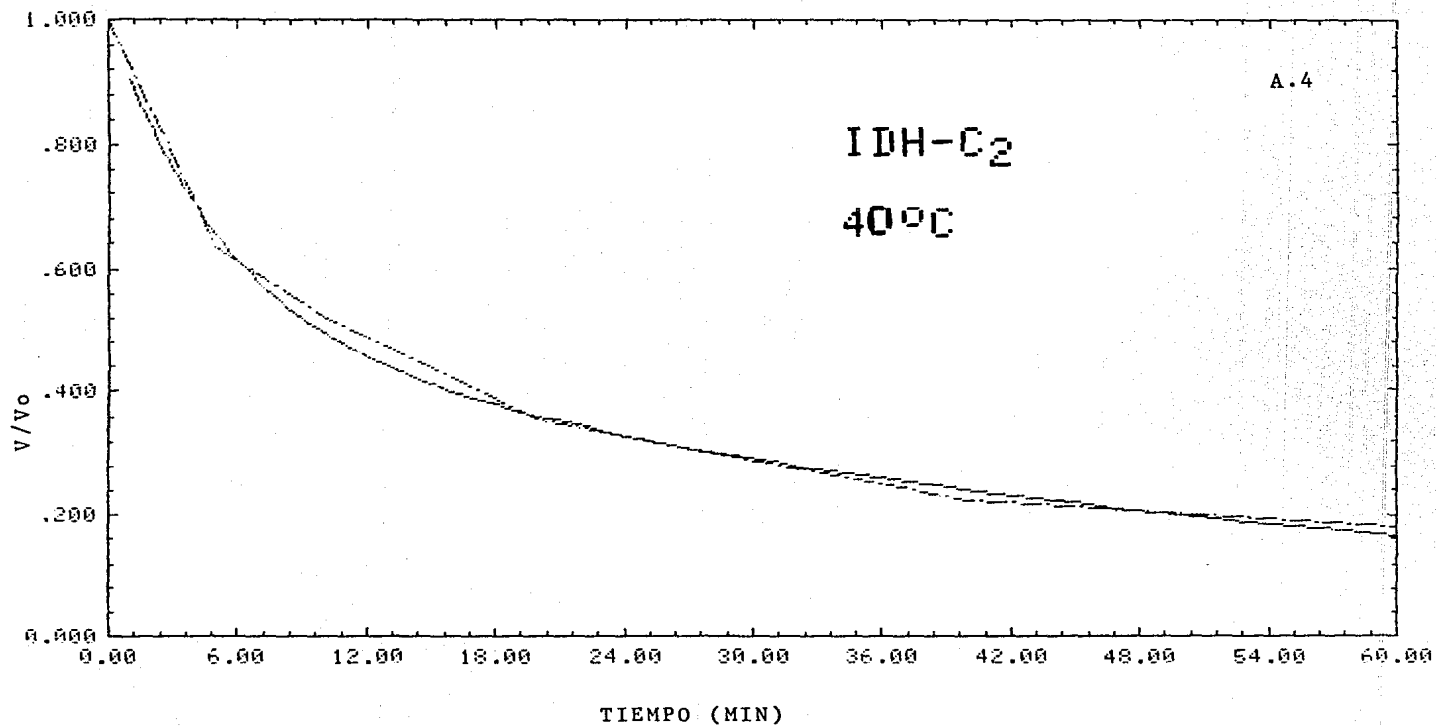
A.8 IDH-C₂ incubada a 45°C en presencia de sustrato (isoc.)

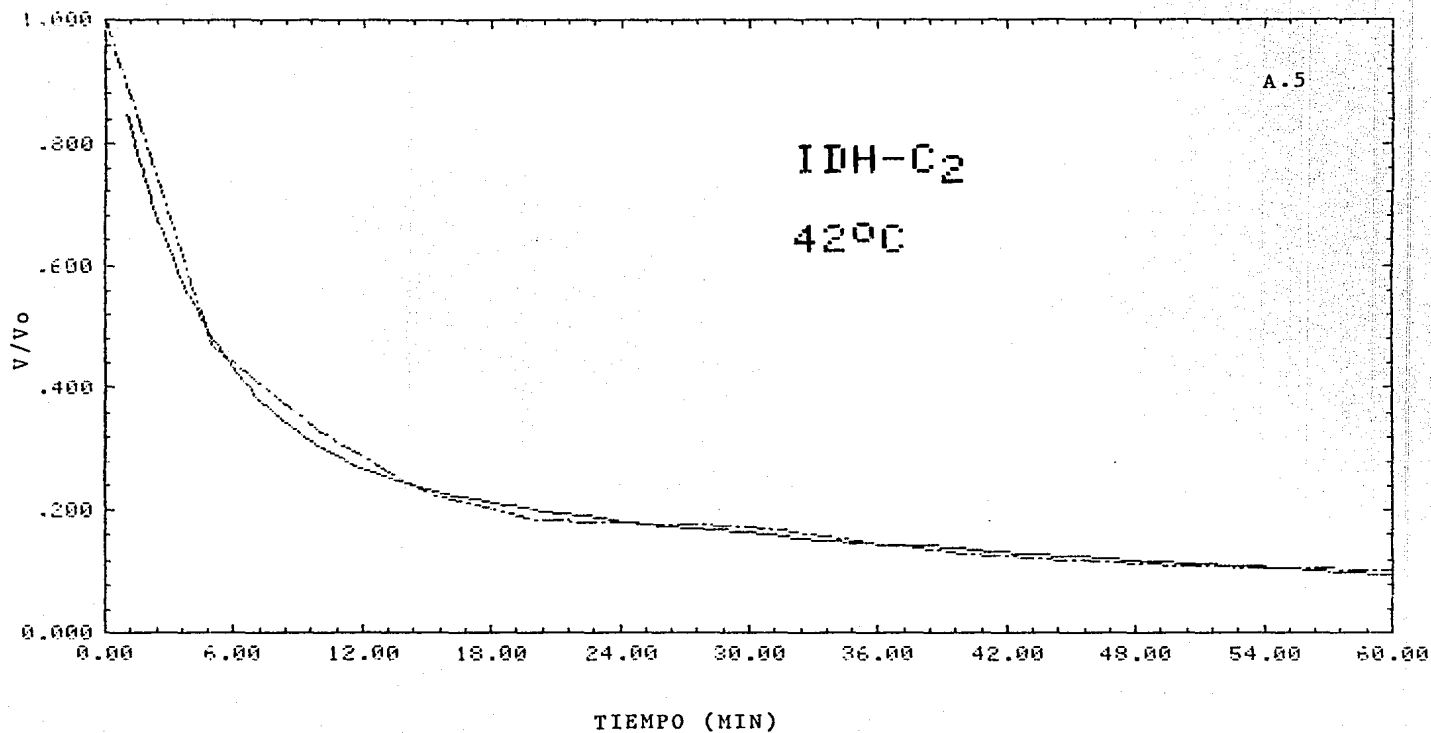
A.9 IDH-C₂ incubada a 45°C en presencia de coenzima (NADP)

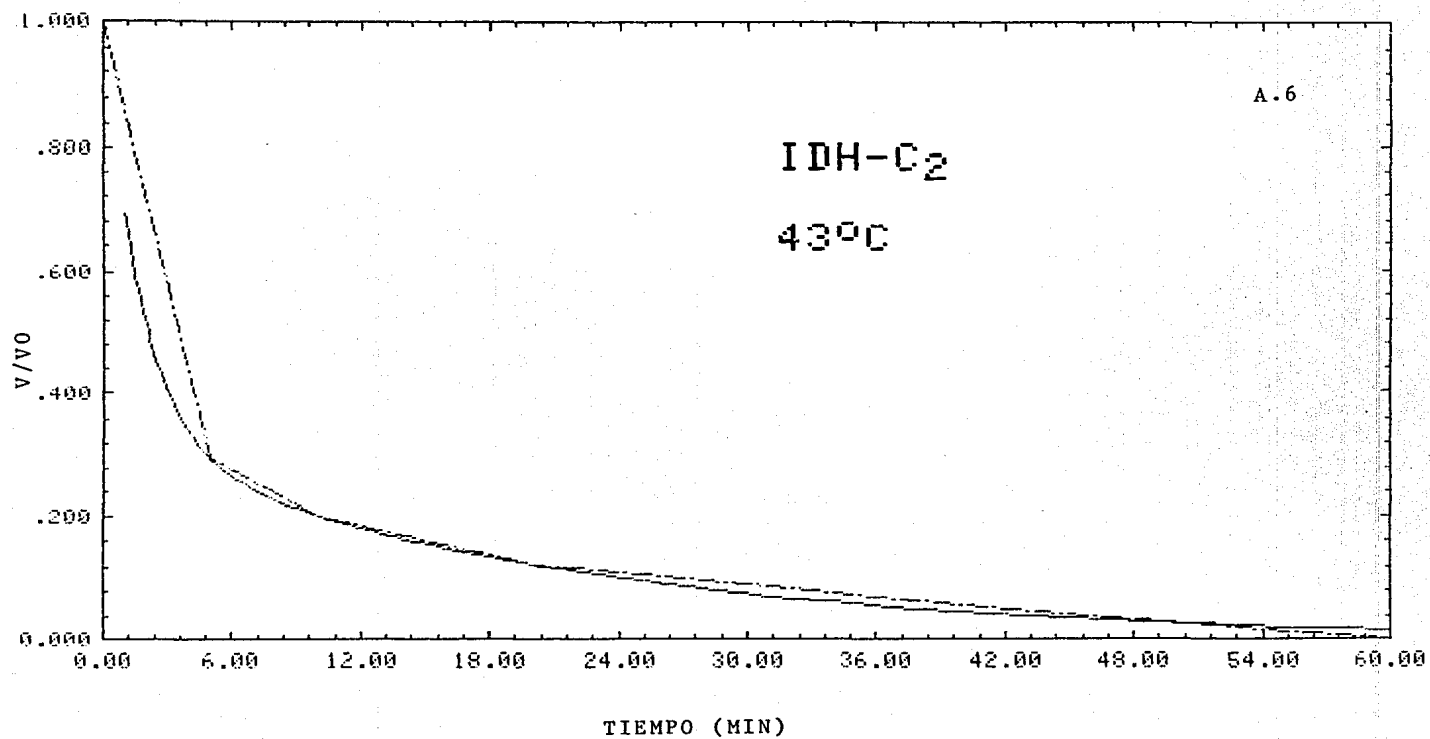








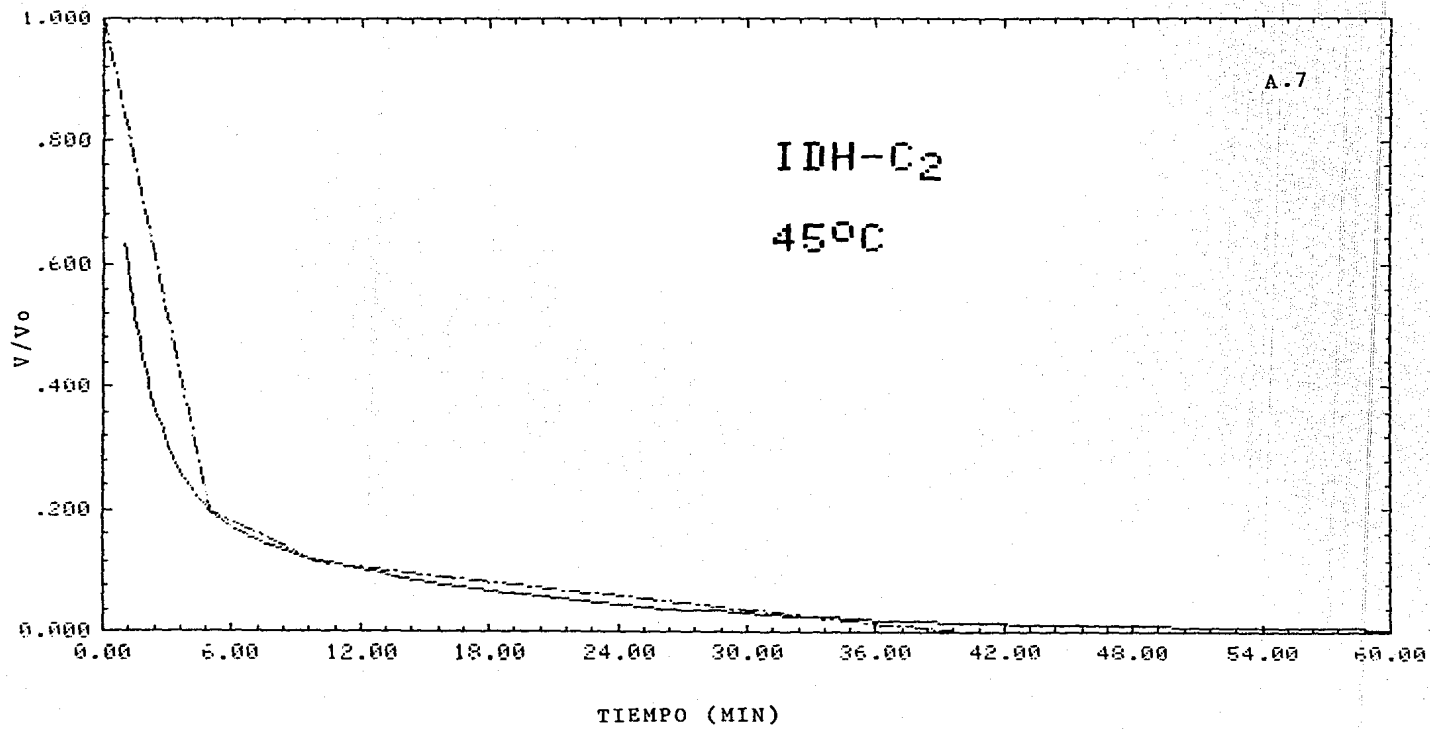


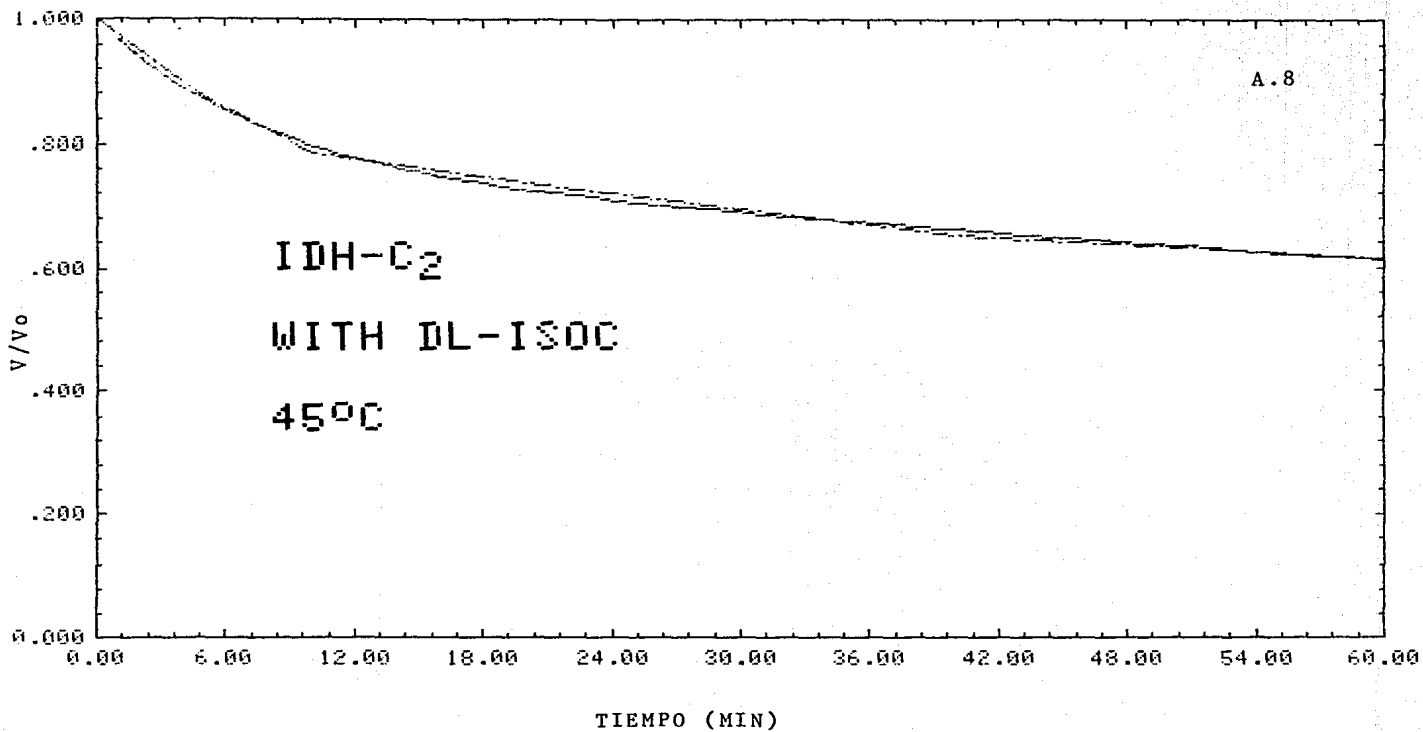


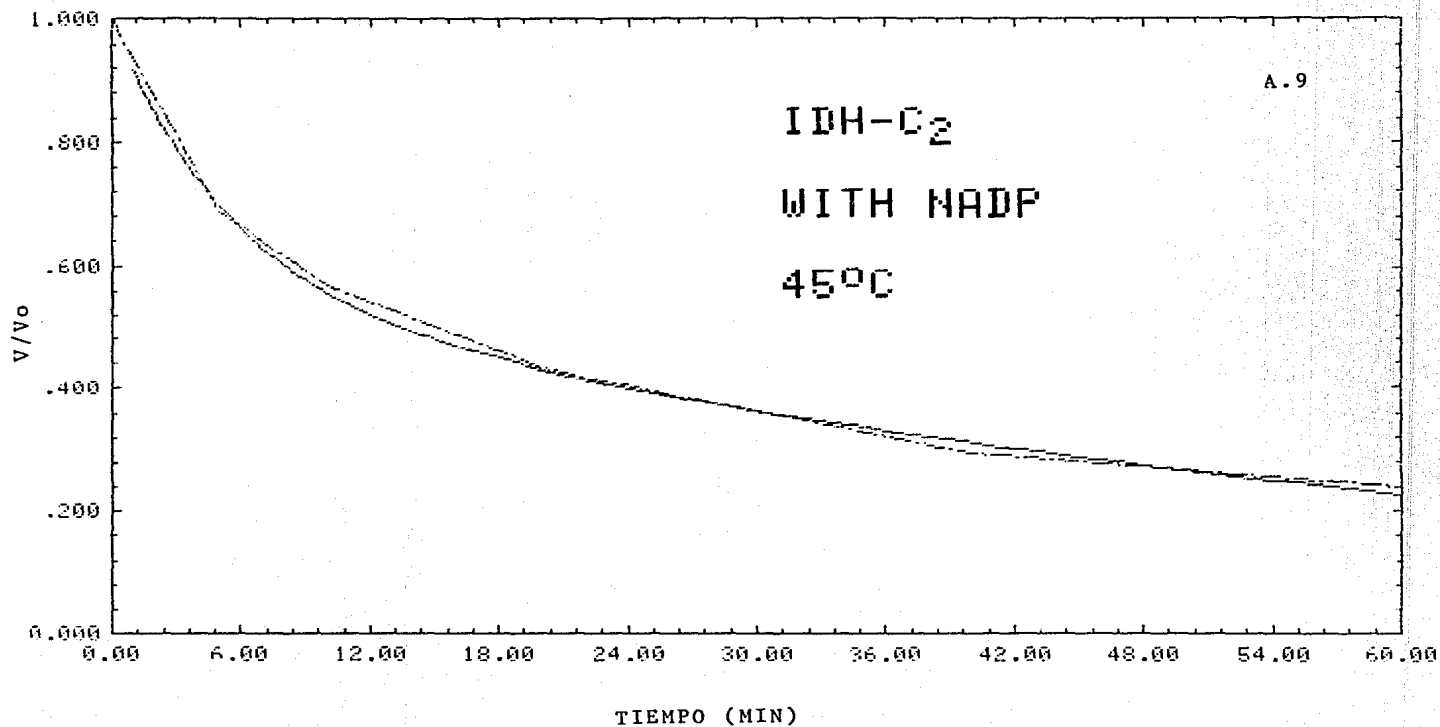
A.6

IDH-C₂

43°C







cuaternaria puede también ser precedida por un cambio en la conformación terciaria. Cambios en la estructura terciaria ocurren en un amplio rango de temperaturas, y una alteración en la conformación a menudo lleva a un cambio en la actividad enzimática (pero no necesariamente pérdida). Las enzimas pueden tener diferentes actividades enzimáticas bajo ciertos regímenes térmicos (Hochachka y Somero, 1973). En adición, cambios estructurales en la enzima pueden alterar la conformación del sitio activo y cambiar los requerimientos energéticos del proceso catalítico (Roberts, 1977). Entonces, el proceso de desnaturalización térmica observado para las isozimas IDH-NADP puede ser descrito como dos estados conformacionales de la proteína dependientes del tiempo y que ocurren a diferente temperatura y tasas de reacción. Se supone que cada estado conformacional sigue un proceso cinético simple de primer orden y que el proceso total de desnaturalización de la proteína es descrito adecuadamente por dos reacciones secuenciales de primer orden. Estas reacciones consisten de una fase rápida en la cual las isozimas IDH presentan un estado conformacional sensible a incrementos de temperatura, y una fase lenta que refleja un nuevo estado conformacional (posible cambio en la estructura cuaternaria y terciaria de la enzima) a mayores temperaturas. Es razonable suponer que la conducta no-lineal de las isozimas IDH, bajo condiciones de desnaturalización, exhibe dos diferentes

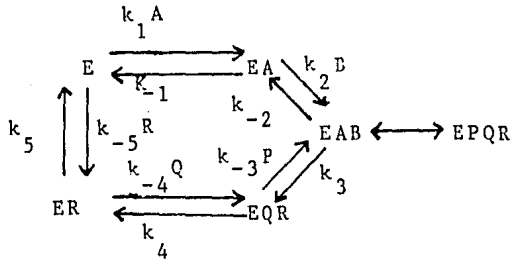
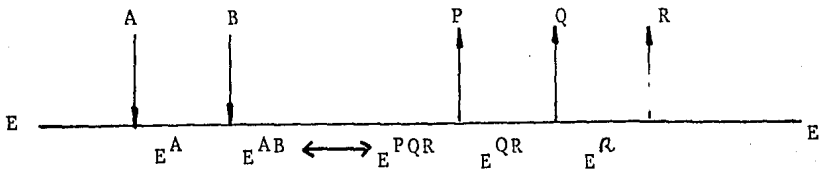
tipos de conducta dinámica (i.e., dos diferentes K_{cat}) para cada estado conformacional.

Aunque los datos se ajustan perfectamente bien a la ecuación 1, no se implica que las diferentes tasas de cambio, pertenecen a una sola clase de transición durante el proceso de desnaturalización, o que la enzima dimérica se disocia en monómeros, porque no se observaron monómeros activos en estos estudios. Además, la especie monomérica de la enzima NADP-IDH de hígado de res es catalíticamente inactiva (Carlier y Pantaloni, 1978).

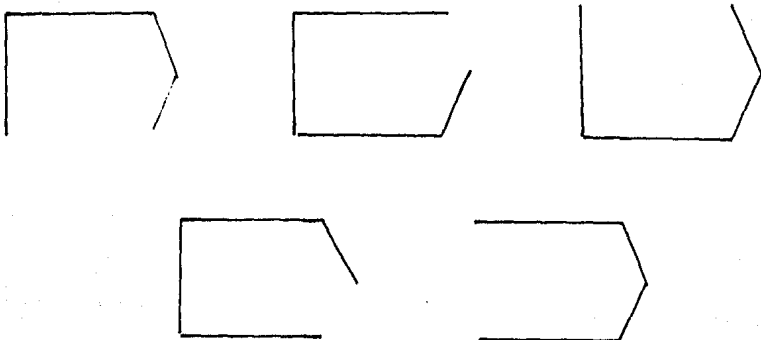
Los datos fueron ajustados con una computadora HP 1000 y un programa paramétrico no-lineal de mínimos cuadrados que estima: (i) los valores de los parámetros, (ii) los límites de confianza respectivos de los errores asociados con los valores paramétricos determinados, y (iii) verifica que los parámetros sean válidos en términos de análisis y significado físico. Los detalles del procedimiento de ajuste son descritos por Turner et al (1981). Este programa no-lineal ha sido utilizado extensamente en el análisis de datos de reacciones de asociación y disociación de subunidades de hemoglobina humana (Turner et al, 1981), y en ambos estudios de cinética de la desnaturalización térmica del heterotetrámero de la deshidrogenasa láctica (Place, 1979) y el dímero de la deshidrogenasa malato (Cashon, 1981) de F. heteroclitus.

B. DERIVACION DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS

Las constantes incluidas en los parametros cinéticos V_{max} , K_m y V_{max}/K_m fueron derivadas suponiendo que las isozimas IDH-NADP siguen un mecanismo BI-TER.



Los 5 patrones de cuatro líneas de interconversión de King-Altman (Segel, 1975) son los siguientes:





$$E/[E]_t = (k_5 k_4 k_3 k_2 [B] + k_{-4} [Q] k_{-3} [P] k_{-2} k_{-1} + k_5 k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P] + k_4 k_5 k_{-1} k_{-2} + k_5 k_4 k_3 k_{-1}) / \text{Denominador}$$



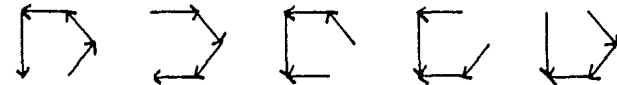
$$EA/[E]_t = (k_1 [A] k_5 k_4 k_3 + k_4 k_5 k_1 [A] k_{-2} + k_1 [A] k_{-4} [Q] k_{-3} [P] k_{-2} + k_{-5} [R] k_{-4} [Q] k_{-3} [P] k_{-2} + k_5 k_1 [A] k_{-2} k_{-3} [P]) / \text{Denominador}$$



$$EAB + EPQR/[E]_t = (k_{-1} k_{-5} [R] k_{-4} [Q] k_{-3} [P] + k_4 k_5 k_1 [A] k_2 [B] + k_2 [B] k_{-3} [P] k_{-4} [Q] k_{-5} [R] + k_1 [A] k_2 [B] k_{-3} [P] k_{-4} [Q] + k_5 k_1 [A] k_2 [B] k_{-3} [P]) / \text{Denominador}$$



$$EQR/[E]_t = (k_5 k_1 [A] k_2 [B] k_3 + k_{-2} k_{-1} k_{-5} [R] k_{-4} [Q] + k_{-5} [R] k_{-4} [Q] k_2 [B] k_3 + k_{-1} k_{-5} [R] k_{-4} [Q] k_3 + k_1 [A] k_2 [B] k_3 k_{-4} [Q]) / \text{Denominador}$$



$$ER/[E]_t = (k_{-5} [R] k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P] + k_1 [A] k_2 [B] k_3 k_4 + k_4 k_{-5} [R] k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_{-5} [R] k_3 k_4 + k_{-5} [R] k_2 [B] k_3 k_4) / \text{Denominador}$$

Denominador = $[E]_t$ = suma de los 25 términos del numerador

$$\begin{aligned}
 [E]_t = & k_4 k_5 k_{-1} (k_{-2} + k_3) + k_1 k_4^5 (k_3 + k_{-2}) [A] \\
 & + k_2 k_3 k_4 k_5 [B] + k_{-1} k_{-2} k_3 k_5 [P] + \\
 & k_{-5} k_{-1} k_4 (k_{-2} + k_3) [R] + k_1 k_2 (k_4 k_5 + \\
 & k_3 k_5 + k_3 k_4) [A] [B] + k_1 k_5 k_{-2} k_{-3} [A] [P] \\
 & + k_1 k_2 k_5 k_{-3} [A] [B] [P] + k_1 k_2 k_3 k_4 [A] [B] [Q] \\
 & + k_1 k_{-2} k_{-3} k_{-4} [A] [P] [Q] + k_1 k_2 k_{-3} k_{-4} \\
 & [A] [B] [P] [Q] + k_2 k_3 k_4 k_{-5} [B] [R] + \\
 & k_2 k_3 k_{-4} k_{-5} [B] [Q] [R] + k_2 k_{-3} k_{-4} k_5 \\
 & [B] [P] [Q] [R] + k_{-1} k_{-4} k_{-5} (k_3 + k_{-2}) [Q] [R] + \\
 & k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-5} [P] [R] + k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} \\
 & [P] [Q] + k_{-3} k_{-4} k_{-5} (k_{-2} + k_{-1}) [P] [Q] [R]
 \end{aligned}$$

Ecuación de velocidad

$$v = (k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 [A] [B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} k_{-5} [P] [Q] [R]) / [E]_t$$

Ecuación conforme a los coeficientes de Cleland

$$\begin{aligned}
 v = & (\text{num } 1 [A] [B] - \text{num } 2 [P] [Q] [R]) / \text{Constante} + \text{Coef}_A [A] + \\
 & \text{Coef}_B [B] + \text{Coef}_{AB} [A] [B] + \text{Coef}_P [P] + \text{Coef}_R [R] + \\
 & \text{Coef}_{PQ} [P] [Q] + \text{Coef}_{PR} [P] [R] + \text{Coef}_{QR} [Q] [R] + \\
 & \text{Coef}_{PQR} [P] [Q] [R] + \text{Coef}_{AP} [A] [P] + \text{Coef}_{ABP} [A] [B] [P] \\
 & + \text{Coef}_{ABQ} [A] [B] [Q] + \text{Coef}_{APQ} [A] [P] [Q] + \text{Coef}_{BR} [B] [R] \\
 & \text{Coef}_{BOR} [B] [Q] [R] + \text{Coef}_{ABPQ} [A] [B] [P] [Q] + \text{Coef}_{BPQR} \\
 & [B] [P] [Q] [R].
 \end{aligned}$$

Numerador y denominador multiplicados por

num 2 / Coef_{AB} Coef_{pQR} y algunos términos por num 1 / num 2

$$v = (\text{num } 1 \text{ num } 2 [A] [B] / \text{Coef}_{AB} \text{ Coef}_{pQR}) - (\text{num } 2 \text{ num } 2 \text{ num } 1 [P] [Q] [R] / \text{Coef}_{AB} \text{ Coef}_{pQR} \text{ num } 1) / \text{Denominador}$$

Denominador = suma de la constante y todos los términos coeficientes.

$$v = [V^f_{\max} V^r_{\max} ([A][B] - [P][Q][R]/Keq)] /$$

$$[(\text{Constante num 2}/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_A \text{ num 2} [A]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_B \text{ num 2} [B]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_{AB} \text{ num 2} [A][B]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_P \text{ num 2 num 1} [P]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_R \text{ num 2 num 1} [R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{PQ} \text{ num 2 num 1} [P][Q]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{PR} \text{ num 2 num 1} [P][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{QR} \text{ num 2 num 1} [Q][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{PQR} \text{ num 2 num 1} [P][Q][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{AP} \text{ num 2 num 1} [A][P]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{ABP} \text{ num 2 num 1} [A][B][P]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{ABQ} \text{ num 2} [A][B][Q]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_{APQ} \text{ num 2 num 1} [A][P][Q]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR} \text{ num 1}) + (\text{Coef}_{BR} \text{ num 2} [B][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_{BQR} \text{ num 2} [B][Q][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_{ABPQ} \text{ num 2 num 1} [A][B][P][Q]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR}) + (\text{Coef}_{BPQR} \text{ num 2} [B][P][Q][R]/\text{Coef}_{AB} \text{Coef}_{PQR})]$$

La ecuación se simplifica a

$$v = [V^f V^r ([A][B] - [P][Q][R]/Keq)] / [V^r K_{ia} K_{mB} + V^r K_{mB} [A] + V^r K_{mA} [B] + V^r [A][B] + (V^f K_{ir} K_{mQ} [P]/Keq) + (V^f K_{iq} K_{mP} [R]/Keq) + (V^f K_{mR} [P][Q]/Keq) + (V^f K_{mQ} [P][R]/Keq) + (V^f K_{mP} [Q][R]/Keq) + (V^f [P][Q][R]/Keq) + V^f K_{mQ} K_{ir} [A][P]/K_{ia} Keq) + (V^r K_{ia} K_{mA} [B][R]/K_{ir}) + (V^r K_{mQ} k_{ir} [A][B][P]/K_{ia} K_{ib} Keq) + (V^r K_{mA} [A][B][Q]/K_{iq}) + (V^f K_{mR} [A][P][Q]/K_{ia} Keq) + (V^r K_{mA} K_{ip} [B][Q][R]/K_{iq} K_{ir}) + V^f K_{mR} [A][B][P][Q]/k_{ia} K_{ib} K_{ip} Keq) + (V^r K_{mB} [B][P][Q][R]/K_{iq} K_{ir})]$$

Donde: $V^f = \text{num 1}/\text{Coef}_{AB}$ $V^r = \text{num 2}/\text{Coef}_{PQR}$

$Keq = \text{num 1}/\text{num 2}$ or

$Keq = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 / k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} k_{-5}$

$K_{mA} = \text{Coef}_B/\text{Coef}_{AB}$, $K_{mB} = \text{Coef}_A/\text{Coef}_{AB}$

$K_{mP} = \text{Coef}_{QR}/\text{Coef}_{PQR}$, $K_{mQ} = \text{Coef}_{PR}/\text{Coef}_{PQR}$

$K_{mR} = \text{Coef}_{PQ}/\text{Coef}_{PQR}$, $K_{ia} = \text{Const}/\text{Coef}_A$

$\text{Coef}_{AB} = \text{Coef}_A/K_{mB}$ y $\text{Constante} = K_{mB} K_{ia}$

$$K_{1b} = \text{Coef}_A / \text{Coef}_{AB} = \text{Coef}_{AP} / \text{Coef}_{ABP} = \\ \text{Coef}_{APQ} / \text{Coef}_{ABPQ}$$

$$K_{1r} = \text{Coef}_P / \text{Coef}_{PR} = \text{Coef}_{PR} / \text{Coef}_{PQR}$$

$$K_{1q} = \text{Coef}_R / \text{Coef}_{QR} = \text{Coef}_{PQ} / \text{Coef}_{PQR} = \\ \text{Coef}_{BPQ} / \text{Coef}_{BPQR}$$

$$K_{1p} = \text{Coef}_{ABPQ} / \text{Coef}_{ABPQR} = \text{Coef}_{ABP} / \text{Coef}_{ABPQ} = \\ \text{Coef}_{BPQ} / \text{Coef}_{BPQR}$$

Para la reacción hacia la derecha (forward reaction) las constantes de los parámetros cinéticos son las siguientes:

$$V_{\max}^f = k_3 k_4 k_5 / k_1 (k_4 k_5 + 3k_5 + k_3 k_4)$$

$$K_m^A = k_3 k_4 k_5 / k_1 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)$$

$$K_m^B = k_4 k_5 (k_3 + k_{-2}) / k_2 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)$$

$$V_{\max}^f / K_m^B = k_2 k_3 / (k_3 + k_{-2})$$

$$V_{\max}^f / K_m^A = K_1 \quad A = \text{NADP} \quad B = \text{Isocitrato}$$

Las constantes incluidas en los parámetros cinéticos K_m y V_{\max}/K_m son idénticas para ambos mecanismos BI BI and BI TER para la reacción hacia la derecha (oxidación de isocitrato).

APENDICE II

APENDICE II

A. APLICACION PRACTICA DE LAS ISOZIMAS

Una de las principales preocupaciones en pesquerías al nivel internacional ha sido la explotación racional y no destructiva de muchos recursos marinos. Sobrepesca y acuicultura provocan la disminución de los recursos genéticos de poblaciones naturales, si las poblaciones marinas y la genética ecológica no son completamente entendidas. Muchas poblaciones naturales de organismos marinos han sido pérdidas por eutroficación, contaminación, sobreexplotación, introducciones y procedimientos de manejo inadecuados (Taggart et al, 1981). Por lo tanto, es imperativo que stocks marinos potencialmente valiosos sean identificados y medidas adecuadas sea tomadas si se desea una explotación y manejo racional de estos stocks. Los esquemas de administración en biología pesquera se basan en el concepto de "unidad stock", el cual depende de la reproducción continua de las especies en presencia de una mortalidad inducida por explotación (Gulland, 1974; 1977).

Varios enfoques han sido utilizados para examinar la estructura de los stocks de organismos marinos de importancia comercial. Por ejemplo, una característica comun de la trucha parda y de otros peces salmónidos, es la extremada variabilidad y plasticidad que presentan en muchos aspectos

de su ecología, morfología y conducta; así, esta variabilidad ha sido usada para reconocer diferentes especies (Taggart et al, 1981).

Entre los taxonomistas de peces, la medición de la diferenciación morfológica por medio de características morfométricas y merísticas de los individuos de diferentes localidades geográficas es también usada para diferenciar stocks (Shaklee y Samollow, 1982). Sin embargo, la contribución relativa de las influencias del medio ambiente y genéticas se refleja en una tremenda variabilidad entre las poblaciones, haciendo difícil separar estos dos aspectos de interacción por estudios tradicionales que incluyen el examen de características morfológicas (Taggart et al, 1981).

Otros enfoques usados para examinar la estructura de un stock incluyen: características de la historia de vida (tiempo de desove, edad, fecundación, etc.), parásitos y patrones de migración, que en ciertas especies claramente indica la existencia de múltiples stocks. Sin embargo, estos enfoques requieren de pesquerías establecidas que provean un gran número de individuos por análisis (Shaklee y Samollow, 1982).

La presencia de múltiples formas moleculares de una enzima (isozimas) y sus variantes alélicas (alozimas) han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la estructura de poblaciones de peces. La inspección electroforética de las

isozimas y alozimas ha permitido estudios de la variación genética dentro y entre especies, minimizando los efectos de la modulación del medio ambiente (Ferguson, 1980), y proveyendo una alternativa para la identificación de stocks de vertebrados e invertebrados marinos de importancia comercial (Jamieson, 1975; Tracey et al, 1975). Esta técnica también provee marcadores útiles para la investigación de poblaciones genéticas de peces (Allendorf y Utter, 1979). La fuerza de este enfoque radica en el hecho de que en casi todos los casos: (i) el fenotipo bioquímico del organismo no es afectado por variables ambientales; (ii) el fenotipo bioquímico de cada individuo es estable a través del tiempo; y (iii) la variación genética observada en las proteínas es casi siempre debida a un factor simple Mendeliano el cual es codominantemente expresado (Ayala, 1975). Por lo tanto, la electroforesis es un medio eficiente para detectar y definir las fronteras existentes entre los stocks, que han resultado del aislamiento o divergencia genética.

La estructura genética de las poblaciones de salmónidos ha sido ampliamente estudiada para describir los patrones de intercambio genético y el grado de aislamiento entre unidades geográficas locales (Allendorf y Phelps, 1981; Utter et al, 1979; Wright et al, 1980).

Los polimorfismos de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica en el salmón del Atlántico Salmo salar han

sido de valor potencial para investigar la población de dos razas del salmón del Atlántico en Irlanda (Cross y Payne, 1977).

Estudios en especies de importancia comercial como la langosta Panulirus marginatus, la lapa Cellana exarata, el pez Pristipomoides filamentosus, y el pez damisela Stegastes fasciolatus han proveído interesantes patrones en la estructura de sus poblaciones en el Archipiélago Hawaiano (Shaklee y Samollow, 1982).

Una inspección electroforética de las alozimas de seis especies de peces de importancia comercial de New Zealand fue llevada a cabo para determinar las fronteras de los stock con el propósito de obtener opciones de captura y manejo de la pesquería (Gauldie y Johnston, 1980). La estructura de la población, localización y número de zonas de desove en la anguila se han estudiado en China y Japón a través del análisis de la variación genética de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica, así como de otros sistemas enzimáticos (Taniguchi y Numachi, 1978).

La distribución de algunos stocks de peces ha sido también correlacionada con la temperatura del agua (Gauldie y Johnston, 1980). Algunos stocks de truchas de aguas costeras interiores tienen alelozimas IDH que poseen una gran tolerancia a altas temperaturas. Esto apoya la noción de que las isozimas IDH-NADP tienen significado adaptativo en esta

especie. Estas especies son diferentes a los stocks de áreas costeras externas del Pacífico del Noroeste (Redding and Schreck, 1979).

La estructura de los stocks de la merluza, Merluccius australis fue estudiada por medio del análisis electroforético de los polimorfismos de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica, como parte de un programa de separación de stocks de especies comerciales importantes en la zona de New Zealand. Los datos obtenidos de estos estudios han sido usados para la administración efectiva de este recurso marino (Smith et al, 1979).

Por lo tanto, los estudios electroforéticos acoplados a investigaciones bioquímicas a nivel molecular (esta tesis) e investigaciones ecológicas son importantes para entender la estructura genética de los organismos marinos con objeto de formular decisiones de política que consideren la protección, conservación y explotación de cualquier recurso pesquero.

La variación de la alozimas en poblaciones marinas, es también útil para detectar contaminación por metales pesados. Estudios en el camarón Palaemon elegans han indicado que existe una tolerancia diferencial de los genotipos en concentraciones variables de mercurio (Nevo et al, 1980). Así, la estructura genética de las isozimas puede ser explorada y potencialmente usada como un sistema para monitorear

la cantidad y calidad de contaminantes marinos.

Finalmente, las isozimas y alozimas han sido también usadas en medicina para ambos propósitos de experimentación y diagnóstico. Por ejemplo, las isozimas de la deshidrogenasa isocítrica y láctica han sido usadas en la búsqueda de patogénesis en varios estadios de enfermedades (Vesell, 1975). Las isozimas han sido también directamente aplicadas al estudio de enfermedades humanas, como en los desórdenes oftálmicos (Ferrell y Majumder, 1982), en ciencia forense (criminología) (Sensabaugh, 1982), y en agricultura para el control de insectos peste (Kitto, 1982).

B. ESTUDIOS FUTUROS

De los estudios de las isozimas de la deshidrogenasa isocítrica NADP específica se infiere que existen diferentes relaciones estructura-función entre ellas y que tienen un papel especializado en el metabolismo y función de las células del pez debido a su diferente distribución celular y especificidad en tejido. Sin embargo, el significado de los polimorfismos proteicos de los loci del hígado no es conocido.

Ya que los polimorfismos proteicos han sido un tema de controversia (Lewontin, 1974; Kimura, 1979) sin resolución satisfactoria, nuestro siguiente objetivo será investigar las propiedades estructurales y funcionales de los productos alélicos del locus *Idh-B* en relación a una variable ambiental modelo (temperatura). Se sabe que la temperatura es una posible fuerza selectiva de adaptación; además, existen correlaciones entre la frecuencia de alelos y la temperatura (Powers y Powers, 1975; Powers y Place, 1978). Por tanto, se examinarán las propiedades catalíticas de las variantes alélicas de la deshidrogenasa isocítrica dependiente de NADP (locus *IDH-B₂*), por medio de estudios de cinética enzimática de estado constante en función de temperatura y pH. Los resultados de esta investigación ayudarán a contestar la siguiente pregunta: ¿Cual es el significado de la variación

genética de las poblaciones naturales?, i.e., ¿están las alozimas IDH mantenidas por selección natural o deriva genética?. Estos estudios proporcionarán un avance al conocimiento acerca del significado de la variación proteica y quizás favorecerá una teoría evolutiva sobre la otra, i.e., seleccionista o neutralista.

BIBLIOGRAFIA

- Able, K.W. and M. Castagna. 1975. Aspects of an undescribed reproductive behavior in Fundulus heteroclitus (Pisces: Cyprinodontidae) from Virginia. Chesapeake Sci., 16:282-284.
- Ainsle, G.R., Jr. and W.W. Cleland. 1982. The effect of oligomeric environment on the kinetic of lactate dehydrogenase subunits. Arch. Biochem. Biophys., 216(1):101-104.
- Allendorf, F.W. and S.R. Phelps. 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38(12): 1507-1514.
- _____ and F.M. Utter. 1973. Gene duplication within the family Salmonidae: Disomic inheritance of two loci reported to be tetrasomic in rainbow trout. Genetics, 74:647-654.
- _____ and F.F. Utter. 1979. "Population genetics" in Fish Physiology (Hoar, W.S., Randall, D.J. and J.R. Brett), Vol III, pp. 407-454. Academic Press, London.
- Alp, P.R., Newsholme, E.A. and V.A. Zammit. 1976. Activities of citrate synthase and NAD-linked and NADP-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochem. J., 154: 689-700.
- American Fisheries Society. 1980. A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada. Special Publication, No. 12, 4th. Ed.
- Anderson, B.M. and M.L. Reynolds. 1965. Multiple inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys., 111: 1-7.
- Aster, P.L. and T.W. Moon, 1977. Activity of NADP-dehydrogenases in the eel Anguilla rostrata. Am. Zool., 17(4):859- .
- Atkinson, D.E., 1977. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation, pp. 109-174, Academic Press, New York. 293 p.
- Ayala, F.J., 1975. Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., 277p.
- Balamir, A. and K. Emerk. 1982. The effects of inorganic salts on the stability of isocitrate dehydrogenase from beef (Bos taurus) heart and liver. Comp. Biochem. Physiol., 71B(3): 489-493.

- Baldwin, J. and P.W. Hochachka. 1970. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization. Acetylcholinesterase from trout brain. Biochem. J., 116: 883-887.
- Barrera, C.R. and P. Jurtshuk. 1970. Characterization of the highly active isocitrate (NADP⁺) dehydrogenase of Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta. 220: 416-429.
- Bauman, D.E., Brown, R.E. and C.L. Davis. 1970. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow and cow. Arch. Biochem. Biophys., 140: 237-244.
- Bell, J.L. and D.N. Baron. 1964. Intracellular distribution of isocitrate dehydrogenases. Biochem. J., 90: 8p.
- Bevington, P.R., 1969. Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
- Bigelow, H.G. and W.C. Schroeder. 1953. Fishes of the Gulf of Maine. United States Fish and Wildlife Service Fishery Bulletin, 53: 162-164.
- Bio Rad. 1977. Laboratories, Chemical Division. Technical Bulletin. 1049: 1-4.
- Black, E.C., Bosomworth, N.J. and G.E. Docherty. 1966. Combined effects of starvation and exercise on glycogen metabolism of rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Fish. Res. Bd. Can., 23: 1461-1463.
- Borgmann, U. and T.W. Moon. 1975. A comparison of lactate dehydrogenases from an ectothermic and an endothermic animal. Can. J. Biochem., 53: 998-1004.
- Boyd, J.F. and R.C. Simmonds. 1974. Continuous laboratory production of fertile Fundulus heteroclitus (Walbaum) eggs lacking chorionic fibrils. J. Fish. Biol., 6: 389-394.
- Bradbury, S.L. and W.B. Jakoby. 1972. Glycerol as an enzyme stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase. Proc. Nat. Acad. Sci., 69: 2373-2376.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Braswell, E.H., 1975. "Subunit interaction in lactate dehydrogenase" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol.I, pp.119-138, Academic Press, New York.

Brewer, J.M., Pesce, A.J. and R.B. Ashworth. 1974. Experimental Techniques in Biochemistry. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 374 p.

Brownlee, K.A., 1960. Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering. John Wiley and Sons, Inc., New York, London.

Brummett, R., 1966. Observations on the eggs and breeding season of Fundulus heteroclitus at Beaufort, North Carolina., Copeia, 1966: 616-620.

Burden C.E., 1956. The failure of hypophysectomized F. heteroclitus to survive in fresh water. Biol. Bull., 110 (1): 8-28.

Burgos, N.M.G.de, Burgos, C., Gutierrez, M. and A. Blanco. 1973. Effect of temperature upon catalytic properties of lactate dehydrogenase isoenzymes from a poikilotherm. Biochim. Biophys. Acta, 351: 333-340.

Burke, W.F., Johanson, R.A. and H.C. Reeves. 1974. NADP-specific isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 351: 333-340.

Buzdygon, B.E., Braginski, J.E. and A.E. Chung. 1973. Isocitrate dehydrogenase from Rhodopseudomonas spheroides: Kinetic mechanism and further characterization. Arch. Biochem. Biophys., 159: 400-408.

Carrier, M.F. and D. Pantaloni. 1973. NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity. Eur. J. Biochem., 37: 341-354.

_____ and D. Pantaloni. 1976a. NADP-linked isocitrate dehydrogenase. Catalytic activation by the reduced enzyme product of the reaction. Biochemistry, 15(8): 1761-1766.

_____ and D. Pantaloni. 1976b. Coenzyme binding by TPN-dependent isocitrate dehydrogenase from beef liver. Equilibrium and kinetic studies. Biochemistry, 15(21): 4703-4712.

_____ and D. Pantaloni. 1978. Slow association-dissociation equilibrium of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver in relation to catalytic activity. Eur. J. Biochem., 89: 511-516.

- Carter, N.D., Tanis, R.J., Tashian, R.E. and R.E. Ferrell, 1973. Characterization of a new variant of human red cell carbonic anhydrase I, CA IF London (102 Glu - Lys). Biochem. Genet., 10: 399-408.
- Cashon, R.E., 1981. "The malate dehydrogenase isozymes and allozymes of Fundulus heteroclitus " Ph.D. Thesis, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.
- _____, Van Beneden, R.J. and D.A. Powers. 1981. Biochemical genetics of Fundulus heteroclitus. (L.). IV Spatial variation in gene frequencies of Idh-A, Idh-B, 6-Pgdh-A, and Est-S. Biochem. Genet., 19: 715-728.
- Chappell, J.B. and B.H. Robinson. 1968. In Metabolic Roles of Citrate (Goodwin, T.W., Ed.), Biochem. Soc. Symp., 27, pp. 23, Academic Press, New York.
- Chen, T.R., 1971. A comparative chromosome study of 20 killifish species of the genus Fundulus (Teleostei: Cyprinodontidae). Chromosoma(Berlin), 29: 255-267.
- Chen, R.F. and G.W.E. Plaut. 1963. Activation and inhibition of DPN-linked isocitrate dehydrogenase of heart by certain nucleotides. Biochemistry, 2: 1023-1032.
- Cheng, M-L., Yamauchi, T. and C.S. Hacker. 1977. Genetic polymorphism of isocitrate dehydrogenase in the Culex pipiens complex. Biochem. Genet., 15: 903-907.
- Chico, E., Satrustegui, J. and A. Machado. 1977. Constancy of the NADP-linked isocitrate dehydrogenase/transhydrogenase ratios of mitochondria of different mammalian tissues. Biochemie, 59: 933-934.
- Chiga, M. and G.W.E. Plaut. 1960. Nucleotide transphosphorylases from liver. I. Purification and properties of an adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase from swine liver. J. Biol. Chem., 235: 3260-3265.
- Chung, A.E. and J.S. Franzer. 1969. Oxidized TPN-specific isocitrate dehydrogenase from Azotobacter vinelandii. Isolation and characterization. Biochemistry, 8: 3175-3184.
- _____ and J.E. Braginski. 1972. Isocitrate dehydrogenase from Rhodospseudomonas spheroides: Purification and characterization. Arch. Biochem. Biophys., 153: 357-367.

Cleland, W.W., 1963. The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrate or products. I. Nomenclature and rate equations. Biochim. Biophys. Acta., 67: 104-137.

_____, 1967. Enzyme kinetics. Annu. Rev. Biochem., 36: 77-112.

_____, 1970. "Steady state kinetics" in The Enzymes (Boyer, P.D., Ed.), 3rd. Ed., Vol.II, pp.1-61, Academic Press, New York.

_____, 1975. What limits the rate of an enzyme catalyzed reaction? Acc. Chem. Res., 8: 145-151.

_____, Thompson, V.W. and R.E. Barden. 1969. "Isocitrate dehydrogenase (TPN-specific) from pig heart" in Methods in Enzymology (Lowenstein, J.M., Ed.), Vol XIII, pp. 30-33.

Colman, R.F., 1968. Effect of modification of a methionyl residue on the kinetic and molecular properties of isocitrate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 243: 2454-2464.

_____, 1975. "Mechanisms for the oxidative decarboxylation of isocitrate: implications for control" in Advances in Enzyme Regulation (Weber, G., Ed.), Vol.13, pp.413-433, Pergamon Press, Great Britain.

_____, Szeto, R.Ch. and P. Cohen. 1970. Pig heart TPN-specific isocitrate dehydrogenase. A single polypeptide chain. Biochemistry, 25: 4945-4949.

Cornish-Bowden, A., 1976. The effect of natural selection on enzymic catalysis. J. Mol. Biol., 101: 1-9.

_____, 1979. Fundamentals of Enzyme Kinetics. Butterworths, London-Boston.

Cox, G.F. and D.D. Davies. 1967. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. Biochem. J., 105: 729-734.

Crabtree, B. and E.A. Newsholme. 1970. The activities of NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenase in insect and vertebrate muscles. Biochem. J., 116, 22p.

Cross, T.F. and R.H. Payne. 1977. NADP-isocitrate dehydrogenase polymorphisms in the Atlantic salmon Salmo salar. J. Fish. Biol., 11: 493-496.

Crowley, P.W., 1975. Natural selection and the michaelis constant. J. Theor. Biol., 50: 461-475.

Dalziel, K., Mc Ferran, N., Matthews, B. and C.H. Reynolds. 1978. Transient kinetics of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart mitochondria. Biochem. J., 171: 743-750.

Davies, J.R. and R.K. Scopes, 1981. Purification and Some tricarboxylic acid cycle enzymes from beef heart using affinity chromatography. Anal. Biochem., 114: 19-27.

Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. and K.M. Jones. 1969. Data for Biochemical Research. 2nd. Ed., Oxford University Press, New York and Oxford.

Denton, R.M. and C.I. Pogson. 1976. Metabolic Regulation. London Chapman and Hall, A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, Inc., New York.

De Sylva, D.P., Kalber, F.A. and C.N. Shuster, 1962. Fishes and ecological conditions in the shore zone of the Delaware River estuary, with notes on other species collected in deeper water. Univ. Del. Mar. Lab. Info. Ser. Publ. No.5, 164p.

Di Michele, L. and M.H. Taylor. 1980. The environmental control of hatching in Fundulus heteroclitus. J. Exp. Zool., 214: 181-187.

_____ and M.H. Taylor. 1981. The mechanism of hatching in Fundulus heteroclitus: development and physiology. J. Exp. Zool., 217: 73-79.

_____, Taylor, M.H. and R. Singleton, Jr., 1981. The hatching enzyme of Fundulus heteroclitus. J. Exp. Zool., 216: 133-140

_____ and D.A. Powers. 1982a. Physiological basis for swimming endurance differences between LDH-B genotypes of Fundulus heteroclitus. Science, 216: 1014-1016.

_____ and D.A. Powers. 1982b. LDH-B genotype-specific hatching times of Fundulus heteroclitus embryos. Nature, 296: 563-564.

Dillon, W.A., 1965. Provisional list of parasites occurring on Fundulus ssp. Va. Jour. Sci., 17(1): 21-31.

Dixon, M., 1953. The effect of pH on the affinities of enzymes for substrates and inhibitors. Biochem., 55: 161-171.

Drapper, N.R. and H. Smith. 1981. Applied Regression Analysis. 2nd. Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Drysdale, J.W., Righetti, P. and F. Bunn. 1971. The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Biochim. Biophys. Acta, 229: 42-50.

Eddy, S., 1957. How to know the fresh water fishes. W.M.C. Brown Company, Dubuque, Iowa.

Ehrlich, R.S. and R.F. Colman. 1976. Influence of substrates and coenzymes on the role of manganous ions in reactions catalyzed by pig heart TPN-dependent isocitrate dehydrogenase. Biochemistry, 15(18): 4034-4041.

Eisenthal, R. and A. Cornish-Bowden. 1974. The direct linear plot. Biochem. J., 139: 715-720.

Erkenbrecher, C.W. and L.H. Stevenson. 1977. Factors related to the distribution of microbial biomass in salt-marsh-creek. Mar. Biol., 40: 121-125.

Ernster, L. and F. Navazio. 1956. The cytoplasmic distribution of isocitrate dehydrogenase. Exptl. Cell. Res., 11: 483-486.

_____ and F. Navazio. 1957. Studies on TPN-linked oxidations I. Pathways of isocitrate oxidation in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 26: 408-415.

Farrell, H.M., Jr., 1980. Purification and properties of NADP⁺: isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. Arch. Biochem. Biophys., 204(2): 551-559.

Fairbanks, G., Steck, T.L. and D.F.H. Wallach. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10: 2606-2617.

Farris, J.S., 1968. "The evolutionary relationships between the species of the killifish genera Fundulus and Profundulus Teleostei: Cyprinodontidae" Ph.D. dissertation, University of Michigan.

Ferguson, A., 1980. Biochemical Systematics and Evolution. Blackie, Glasgow.

Ferhst, A., 1977. Enzyme Structure and Function. W.H. Freeman and Co.

Ferrell, R.E. and P.O. Majumder. 1982. "Application of isozyme studies to human disease: mapping inherited ophthalmic dis-

orders" title in Program and Abstracts, 4th. International Congress on Isozymes, p.18. The University of Texas at Austin, Texas.

Fischer, L., 1971. An Introduction to Gel Chromatography. 3rd. Ed., North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Fisher, K.C., 1958. "An approach to the organ and cellular physiology of adaptation to temperature in fish and small mammals" in Physiological Adaptation (Prosser, C.L., Ed.), pp.3-49, American Physiological Society, Washington, D.C.

Fisher, R.A., Putt, W. and H. Harris. 1977. The distribution of isoelectric points of human soluble proteins and in particular of the enzyme products of 88 human gene loci. Ann. Hum. Genet., Lond., 40: 371-381.

Fleming, W.R., Scheffel, K.G. and J.R. Linton. 1962. Studies on the gill cholinesterase activity of several cyprinodontid fishes. Comp. Biochem. Physiol., 6(3): 205-213.

Foster, N.R., 1967. Trends in the evolution of reproductive behavior in killifishes. Stud. in Trop. Oceanogr., 5: 549-566.

Fritz, E.S., Meredith, W.H. and V.A. Lotrich. 1975. Fall and winter movements and activity level of the mummichog, Fundulus heteroclitus, in a tidal creek. Chesapeake Science, 16: 211-215.

Gabbott, P.A. and E.J.H. Head. 1980. Seasonal changes in the specific activities of the pentose phosphate pathway enzymes. G6PDH and 6PGDH and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the bivalves Mytilus edulis, Ostrea edulis and Crassostrea gigas. Comp. Biochem. Physiol., 66 B: 279-284.

Garnak, M. and H.C. Reeves. 1979. Purification and properties of phosphorylated isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. J. Biol. Chem., 254 (16): 7915-7920.

Garside, E.T. and Z.K. Chin-Yuen-Kee. 1972. Influence of osmotic stress on upper lethal temperatures in the cyprinodontid fish Fundulus heteroclitus (L.) Can. J. Zool., 50: 787--791.

Gauldie, R.W. and A.J. Johnston. 1980. The geographical distribution of phosphoglucomutase and glucose phosphate isomerase alleles of some New Zealand fishes. Comp. Biochem. Physiol., 66 B: 171-183.

Geer, B.W. Kamiak, S.N., Kidd, K.R., Nishimura, R.A. and S.J. Yemm. 1976. Regulation of the oxidative NADP-enzyme tissue levels in Drosophila melanogaster I. Modulation by dietary carbohydrate and lipid. J. Exp. Zool., 195: 15-32.

Gekko, K. and S.N. Timasheff. 1981. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. Biochemistry, 20: 4677-4686.

Goebell, H. and M. Klingenberg. 1963a. High activity of DPN-linked isocitrate dehydrogenase in mitochondria from various organs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 13(3): 209-212.

_____ and M. Klingenberg. 1963b. DPN-linked isocitrate dehydrogenase in near constant proportion to the respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 13(3): 213-216.

_____ and M. Klingenberg. 1964. DPN-spezifische isocitrat dehydrogenase der mitochondrien. Biochemische Zeitschrift, 340: 441-464.

Griffith, R.W., 1972. "Studies on the physiology and evolution of killifishes of the genus Fundulus" Ph.D. dissertation, Yale University.

Gulland, J.A., 1974. The Management of Marine Fisheries. Dept. Fish. F.A.O., Rome, Bristol: Scientifica, LTD.

_____, 1977. Fish Population Dynamics. Dept. Fish. F.A.O., Rome. John Wiley & Sons, London.

Gumbmann, M. and A.L. Tappel. 1962. The tricarboxylic acid cycle in fish. Arch. Biochem. Biophys., 98: 262-270.

Hart, J.S., 1969. Respiration of the winnipeg gold eye (Hiodon alosoides). J. Fish. Res. Bd. Can., 25: 2603-2608.

Head, J.H., 1980. NADP-dependant isocitrate dehydrogenase from the Mussel Mytilus edulis (L.): Kinetic studies. Eur. J. Biochem., 111: 581-586.

_____ and P.A. Gabbott. 1980. Properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the mussel Mytilus edulis(L.), Comp. Biochem. Physiol., 66 B: 285-289.

Hedrick, J.L. and A.J. Smith. 1968. Size and change isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys., 126: 155-164.

- Henderson N.S., 1965. Isozymes of isocitrate dehydrogenase: Subunit structure and intracellular location. J. Exp. Zool., 158: 263-274.
- Higashi, T., Maruyama, E., Otani, T. and Y. Sakamoto. 1965. Studies on the isocitrate dehydrogenase. J. Biochem., 57 (6): 793-798.
- Hochachka, P.W., 1969. "Intermediary metabolism in fishes" in Fish Physiology (Hoar, W.S. and D.J. Randal, Eds.), Vol I, pp. 351-389, Academic Press, New York.
- _____, 1973. "Basic strategies and mechanisms of enzyme adaptation to temperature" in Effects of temperature on ectothermic organisms (Wieser, N. Ed.), pp. 69-82, Springer-Verlag, N.Y., Heidelberg, Berlin.
- _____ and G.N. Somero. 1973. Strategies of Biochemical Adaptation, W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto.
- Horecker, B.L., 1975. "Biochemistry of isozymes" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol. I, pp. 11-38, Academic Press, N.Y.
- Hoskins, M.A. and M. Aleksink. 1973. Effects of temperature on the kinetics of malate dehydrogenase from a cold climate reptile, Thamnophis sirtalis parietalis. Comp. Biochem. Physiol., 45 B: 343-353.
- Howard, R.L. and R.R. Becker. 1970. Isolation and some properties of the TPN-isocitrate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. J. Biol. Chem., 245 (12): 3186-3194.
- Hulsmann, W.C., Wit-Peeters, E.M. and C. Benckhuysen. 1966. "Factors influencing fatty acid metabolism in mitochondria" in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and Slater, E.C., Eds.), Vol 7, pp. 460-475, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Huver, CH.W., 1973. A Bibliography of the Genus Fundulus. G.K. Hall and Co., Boston, Mass.
- Hy, M. and H.C. Reeves. 1976. NADP-specific isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. III. Two-step purification employing affinity chromatography. Biochim. Biophys. acta, 445: 280-285.
- Ikeuchi, Y., Ito, T. and T. Fukazawa. 1981. A kinetic analysis of thermal denaturation of F-actin. Int. J. Biochem., 13: 1065-1069.

Illingworth, J.A., 1972. Anomalous behavior of yeast isocitrate dehydrogenase during isoelectric focusing. Biochem. J., 129: 1125-1130.

_____ and K.F. Tipton. 1970. Purification and properties of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from pig liver cytoplasm. Biochem. J., 118: 253-258.

Ingebretsen, O. Ch. and T. Sanner. 1976. Activation of NADP-specific isocitrate dehydrogenase by chelating agents. Arch. Biochem. Biophys., 176: 442-448.

Islam, M., Bell, J.L. and D.W. Baron. 1972. Purification and comparative properties of isoenzymes of NADP-isocitrate dehydrogenase from rat heart liver. Biochem. J., 129: 1003-1011.

Jacobs, S., 1973. Effect of isoelectric focusing on the aminoacid composition of proteins. Analyst, 98: 25-33.

Jamieson, A., 1975. "Enzyme types of Atlantic cod stocks on the North American banks" in Isozymes, Genetics and Evolution (Markert, C.L., Ed.), Vol. IV, pp. 491-515, Academic Press, New York.

Jarabak, J., Seeds, A.E., Jr. and P. Talalay. 1966. Reversible cold inactivation of a 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: protective effect of glycerol. Biochemistry, 5(4): 1269-1278.

Johnston, I.A., 1977. A comparative study of glycolysis in red and white muscles of the trout (Salmo gairdneri) and mirror carp (Cyprinus carpio). J. Fish. Biol., 11: 575-588.

_____ and N.J. Walesby. 1977. Molecular mechanisms of temperature adaptation in fish myofibrillar adenosine triphosphatases. J. Comp. Physiol., 119: 195-206.

Johnson, G.B., 1974. Enzyme polymorphisms and metabolism. Science, 184: 28-37.

Joseph, E.B. and U. P. Saskena. 1966. Determination of salinity tolerances in mummichog (F. heteroclitus) larvae obtained from hormone-induced spawning. Ches. Sci., 7(4): 193-197.

Kanungo, M.S. and C.L. Prosser. 1974. Physiological and biochemical adaptation of goldfish to cold and warm temperatures. II. Oxygen consumption of liver homogenate; oxygen consumption and oxidative phosphorylation of liver mitochondria. J. Cell. Comp. Physiol., 54: 265-274.

Kaplan, N.O., 1972. Pyridine nucleotide transhydrogenases. The Harvey Lectures, 66: 105-133.

_____, Colowick, S.P., and E.F. Neufeld. 1953. Pyridine nucleotide transhydrogenase. III. Animal tissue transhydrogenases. J. Biol. Chem., 253: 1-16.

_____, Swartz, M. N., Frech, M.E. and M.M. Ciotti. 1956. Phosphorylative and nonphosphorylative pathways of electron transfer in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci., 42(8): 481-487.

Katz, A.M. and W. Kalow, 1965. Electrophoretic characterization of human dehydrogenases. Can. J. Biochem., 43: 1653-1659.

Kijima, A. and Y. Fujio. 1977. Genetic control of isocitrate dehydrogenase isozymes in chum salmon. Tohoku Journal of Agricultural Research, 28(2): 96-103.

Kimura, M., 1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. Genet. Res., 11: 247-269.

_____, 1979. The neutral theory of molecular evolution. Sci. Am., 241 (5): 94-104.

Kitto, B., 1982. "Biological control of insect pests" title in Program and Abstracts, 4th Int. Congress on Isozymes, p.18, The University of Texas at Austin, Texas.

Kleber, H.-P. and H. Aurich. 1976. Control of NADP-specific isocitrate dehydrogenase from Acinetobacter by nucleotides FEBS lett., 61: 282-283.

Klingenberg, M. and E. Pfaff. 1966. "Structural and functional compartmentation in mitochondria" in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., Slater, E.C., Eds.), Vol.7, pp. 180-201, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Kneib, R.T., 1980. "The responses of a soft-sediment intertidal community to experimental manipulations of the population size structure and density of a predator, Fundulus heteroclitus (L.)" Ph. D. dissertation, University of North Carolina, Chapel Hill.

Kornberg, H.L., 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in Escherichia coli. Biochem. J., 99: 1-11.

- Kusakina, A.A. and A.N. Vinogradova. 1967. "Species differences in the heat-resistance of protoplasmic proteins of multicellular poikilothermic animals" in The cell and Environmental Temperature (Prosser, C.L., Ed.), pp. 335-343, Pergamon Press, New York.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lehninger, A.L., 1975. Biochemistry, 2nd. Ed., Worth Publishers, Inc.
- Leim, A.H. and W.B. Scott, 1966. Fishes of the Atlantic Coast of Canada. Fish. Res. Bd. Can. Bull., No.135, 485 p.
- Lewontin, R.C., 1973. Population genetics. Am. Rev. Genet., 7: 1-17.
- _____, 1974. The Genetic Basis of Evolutionary Change. Columbia University Press, New York.
- _____ and J.L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, 54: 595-609.
- Londesborough, J.C. and K. Dalziel. 1970. In Pyridine nucleotide dependent dehydrogenases. Proc. Adv. Study Inst., (Sund, H., Ed.), pp. 315-324, Springer-Verlag Berlin.
- Lotrich, V.A., 1975. Summer home range and movement of Fundulus heteroclitus (Linnaeus) in a tidal creek. Ecology, 56: 191-198.
- Low, P.S., Bada, J.L. and G.N. Somero. 1973. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. Proc. Nat. Acad. Sci., 70: 430-432.
- _____ and G.N. Somero. 1974. Temperature adaptation of enzymes: A proposed molecular basis for the different catalytic efficiencies of enzymes from ectotherms and endotherms. Comp. Biochem. Physiol., 49 B: 307-312.
- _____ and G.N. Somero. 1976. Adaptation of muscle pyruvate kinases to environmental temperatures and pressures. J. Exp. Zool., 198: 1-12.

- Lowenstein, J.M., 1961. The pathway of hydrogen in biosynthesis. II. Extramitochondrial isocitrate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 236: 1217-1219.
- Mac Farlane, N., Mathews, B. and K. Dalziel. 1977. The purification and properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from ox-heart mitochondria. Eur. J. Biochem., 74: 553-559.
- Markert, C.L., 1975. Isozymes. Vol I, II, III, and IV. Academic Press, New York.
- _____ and G.S. Whitt. 1968. Molecular varieties of isozymes. Experientia, 24: 977-991.
- Mc Cormak, J.G. and R.M. Denton. 1981. A comparative study of the regulation by Ca^{2+} of the activities of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and NAD-isocitrate dehydrogenase from a variety of sources. Biochem. J., 196: 619-624.
- Mc Ginnis, A.J., Cheldelin, V.H. and R.W. Newburgh. 1956. Enzyme studies of various stages of the blowfly Phormia regina (meig). Arch. Biochem. Biophys., 63: 427-
- Marr, J.J. and M.M. Weber. 1969. Feedback inhibition of an allosteric TPN-nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 244: 5709-5712.
- _____ and M.M. Weber. 1973. Kinetic studies of a NADP-specific isocitrate dehydrogenase from Salmonella thymurium. Purification and reaction mechanism. Arch. Biochem. Biophys., 158: 782-791.
- Meredith, W.H. and V.A. Lotrich. 1979. Production dynamics of a tidal creek population of Fundulus heteroclitus (Linnaeus). Estuarine Coastal Mar. Sci., 8: 99-118.
- Merritt, R.B., 1972. Geographic distribution and enzymatic properties of lactate dehydrogenase allozymes in the fathead minnow, Pimephales promelas. Am. Nat., 196: 173-184.
- Miller, R.R., 1955. An annotated list of the American Cyprinodontid fishes of the genus Fundulus with the description of Fundulus persimilis from Yucatan. Occ. Papers Mus. Zool., Univ. Mich., No. 568, 27 p.
- Minezawa, M., Moriwaki, K. and K. Kondo. 1980. The third allele of supernatant isocitrate dehydrogenase of house mouse Idh-1^C, originates from Asian Continent. Japan J. Genet-ics., 55(5): 389-396.

Mitton, J.B. and R.K. Koehn. 1975. Genetic organization and adaptive response of allozymes to ecological variables in Fundulus heteroclitus. Genetics, 79: 97-112.

Moon, T.W., 1975. "Temperature adaptation: isozymic function and the maintenance of heterogeneity" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol.II, pp. 207-220, Academic Press, New York.

_____ and P.W. Hochachka. 1971a. Temperature and enzyme activity in poikilotherms. Isocitrate dehydrogenase in rainbow-trout liver. Biochem. J., 123: 695-705.

_____ and P.W. Hochachka. 1971b. Effect of thermal acclimation on multiple forms of the liver-soluble NADP-linked isocitrate dehydrogenase in the family Salmonidae. Comp. Biochem. Physiol., 40B: 207-213.

_____ and P.W. Hochachka. 1972. Temperature and the kinetic analysis of trout isocitrate dehydrogenase. Comp. Biochem. Physiol., 42 B: 725-730.

_____ and G. Ouellet. 1979. The oxidation of tri-carboxylic acid cycle intermediates, with particular reference to isocitrate, by intact mitochondria isolated from the liver of the american eel Anguilla rostrata Le Sueur. Arch. Biochem. Biophys., 195 (2): 438-452.

Mosbach, K., 1976. Immobilized Enzymes. FEBS lett., 62: E80-E95.

Nagaoka, T., Hachimori, A., Takeda, A. and T. Samejima. 1977. DNTB modification of SH-groups of isocitrate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus purified by affinity chromatography. J. Biochem., 81: 71-78.

Nevo, E.T., Perl, A.B. and D. Wool. 1981. Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. Experientia, 37: 1152-1154.

Newman, H.H., 1907. Spawning behavior and sexual dimorphism in Fundulus heteroclitus and allied fish. Biol. Bull., 12: 314-345.

Newsholme, E.A. and C. Start. 1973. Regulation in Metabolism, pp. 132-137, John Wiley & Sons, London, New York.

Nicholls, D.G. and P.B. Garland. 1969. The control of isocitrate oxidation by rat liver mitochondria. Biochem. J., 114: 215-225.

- Nixon, S.W. and C.A. Oviatt. 1973. Ecology of a New England salt marsh. Ecolog. Monogr., 43: 463-498.
- Northrop, D.B. and W.W. Cleland. 1974. The kinetics of pig heart TPN-isocitrate dehydrogenase. II. Dead-end and multiple inhibition studies. J. Biol. Chem., 249(9): 2928-2931.
- Pegoraro, B and Ch.-Y. Lee. 1979. Comparative biochemical studies of isozymes of isocitrate dehydrogenase from the mouse. Mol. Cell. Biochem., 24(1): 3-8.
- _____, Yuan, J.H. and Ch.-Y. Lee. 1979. Purification and structural properties of isozymes of isocitrate dehydrogenase from the mouse. Mol. Cell. Biochem., 23(3): 177-184.
- Pette, D., 1966. "Mitochondrial enzyme activities" in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and E.C. Slater, Eds.), Vol.7, pp. 28-50, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Pickford, G.E., 1953. A study of the hypophysectomized male killifish, Fundulus heteroclitus (Linn). Bull. Bing. Ocean. Coll., 14: 5-41.
- Place, A.R., 1979. "The lactate dehydrogenase allozymes of Fundulus heteroclitus (Lin.): A study in molecular evolution" Ph.D. Thesis, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.
- _____ and D.A. Powers. 1978. Genetic bases for protein polymorphism in Fundulus heteroclitus (L.) I. Lactate dehydrogenase (Ldh-B), malate dehydrogenase (Mdh-A), glucosephosphate isomerase (Gpi-B), and phosphoglucomutase (Pgm-A). Biochem. Genet., 16: 577-591.
- _____ and D.A. Powers. 1979. Genetic variation and relative catalytic efficiencies: Lactate dehydrogenase B allozymes of Fundulus heteroclitus. Proc. Natl. Acad. Sci., 76(5): 2354-2358.
- Plaut, G.W.E., 1962. "Isocitrate dehydrogenase (TPN- linked) from pig heart (revised procedure)" in Methods in Enzymology (Colowick, S.P. and N.O. Kaplan, Eds.), Vol.V, pp. 645-651, Academic Press, New York.
- _____, 1969. "Isocitrate dehydrogenase (DPN- specific) from bovine heart" in Methods in Enzymology (Lowenstein, J. M., Ed.) Vol XIII, pp. 34-42.

_____ and T. Aogaichi. 1967. The separation of DPN-linked and TPN-linked isocitrate dehydrogenase activities of mammalian liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28(4): 628-634.

Powers, D.A., 1972. Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes. Science, 177: 360-362.

_____ and A.R. Place. 1978. Biochemical genetics of Fundulus heteroclitus (L.) I. Temporal and spatial variation in gene frequencies of Ldh-B, Mdh-A, Gpi-B, and Pgm-A. Biochem. Genet., 16: 593-607.

_____ and D. Powers. 1975. "Predicting gene frequencies in natural populations: A testable hypothesis" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.) Vol. IV, pp. 63-84, Academic Press, N.Y.

Prakash, S., Lewontin, R. and J. Hubby. 1969. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of Drosophila pseudobscura. Genetics, 61: 841-858.

Prosser, C.L., 1967. Molecular mechanisms of temperature adaptation. Amer. Assoc. Adv. Sci., No. 84, Washington, D.C.

_____, 1973. Comparative Animal Physiology. 3rd. Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.

_____, 1975. "Physiological adaptations in animals" in Physiological Adaptations to the environment (Vernberg, F.J., Ed.), pp. 3-18,

Purich, D.F. and H.J. Fromm, 1972. A possible role for kinetic reaction mechanism dependent substrate and product effects in enzyme regulation. In Curr. Top. Cell. Reg., 6: 131-167.

Quiroz-Gutierrez, A. and S. Ohno, 1970. The evidence of gene duplication for S-form NADP-linked isocitrate dehydrogenase in carp and goldfish. Biochem. Genet., 4: 93-99.

Rahn, H., Reeves, R.B. and B.J. Howell. 1975. Hydrogen ion regulation, temperature, and evolution. Am. Rev. Resp. Dis., 112: 165-172.

Redding, J.M. and C.B. Schreck, 1979. Possible adaptive significance of certain enzyme polymorphisms in steelhead trout (Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Board Can., 36: 544-551.

Reeves, H.C., Brehmeyer, B.A. and S.J. Ajl. 1968. Multiple forms of bacterial NADP-specific isocitrate dehydrogenase. Science, 162: 359-360.

_____, Daumy, G.O., Lin, Ch.Ch and M. Houston. 1972. NADP-specific isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. I. Purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta, 258: 27-39.

Reinitz, G.L., 1977. Inheritance of muscle and liver types of supernatant NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in rainbow trout (*Salmo gairdineri*). Biochem. Genet., 15: 445-454.

Relyea, K.G., 1967. "Systematic study of two species complexes of brackfish water *Fundulus* (Pisces: Cyprinodontidae)" Ph. D. Thesis, Tulane University.

Rippa, M., Bellini, T. Signorini, M. and F. Dallochio. 1981a. Evidence for multiple pairs of vicinal thiols in some proteins. J. Biol. Chem., 256 (1): 451-455.

_____, Signorini, M. and T. Bellini. 1981b. The effect of inorganic phosphate on the stability of some enzymes. Biochem. J., 197: 747-749.

Roberts, D.V., 1977. Enzyme Kinetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Rosenmann, E., Gonzalez, A.M., Hein, S. and F. Marcus. 1977. Carp (*Cyprinus carpio*) muscle fructose 1,6 biphosphatase: purification and some properties. Comp. Biochem. Physiol., 58 B: 291-295.

Ruffo, A., Malcovati, M. and A. Adinolfi. 1966. "Control of the cytric acid cycle by glyoxylate in rat liver mitochondria" in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and E.C. Slater, Eds.), Vol 7, pp. 518-524, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Ruwart, M.J. and C.H. Suelter. 1971. Activation of yeast pyruvate kinase by natural and artificial cryoprotectants. J. Biol. Chem., 246: 5990-5993.

Scandalios, J.G., Liu, E. and M. Campeau. 1972. The effects of intragenic and intergenic complementation on catalase structure and function in maize: A molecular approach to heterosis. Arch. Biochem. Biophys., 153: 695-705.

Schmelz, G.W., 1964. "A natural history of the mummichog, Fundulus heteroclitus (linnaeus), in Canary creek marsh" M.S. Thesis, University of Delaware.

Scopes, R.K., 1981. Quantitative studies of ion-exchange and affinity elution chromatography of enzymes. Anal. Biochem., 114: 8-18.

Seelig, G.F. and R.F. Colman. 1977. Human heart TPN- specific isocitrate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 252(11): 3671-3678.

_____ and R.F. Colman. 1978. Characterization of the physicochemical and catalytic properties of human heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys., 188(2): 394-409.

Segel, I.H., 1975. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, New York.

_____, 1976. Biochemical Calculations. 2nd. Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.

Self, C.H. and D.J. Weitzmann. 1972. The isocitrate dehydrogenase of Acinetobacter lwoffii. Separation and properties of two NADP-linked isoenzymes. Biochem. J., 130: 211-219.

Sensabaugh, G.F., 1982. "Applications of polymorphic enzymes in forensic science" title in Programs and Abstracts, 4th Int. Congress on Isozymes, p.18, The University of Texas at Austin, Texas.

Setzer, P.Y., 1970. An analysis of a natural hybrid swarm by means of chromosome morphology. Trans. Am. Fish. Soc., 99: 139-146.

Shaklee, J.B., 1975. "The role of subunit interactions in the genesis of non-binomial lactate dehydrogenase isozymes distributions" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol. I, pp. 101-118, Academic Press, New York.

_____ and P.B. Samollow. 1982. "Genetic aspects of a population structure of four species in the Northwestern Hawaiian islands" in Proceedings of the Symposium on Status of Resource Investigations in the Northwestern Hawaiian Islands (Grigg, R.W. and R.T. Pfund, Eds.), Sea Grant Miscellaneous Report. UNIHI-SEAGRANT-MR-80-04.

Shaw, C.R. and R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: A compilation of recipes. Biochem. Genet., 4: 297-320.

Shio, J. and H. Ozaki, 1968. Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate. J. Biochem. (Tokyo), 64: 45-53.

Siciliano, M.J. and D.A. Wright. 1973. Evidence for multiple unlinked genetic loci for isocitrate dehydrogenase in fish of the genus Xiphophorus. Copeia, 1: 158-161.

Siebert, G., Carsiotis, M. and G.E. Plaut. 1957a. The enzymatic properties of isocitric dehydrogenase. J. Biol. Chem., 226: 977-991.

_____, Dubuc, J., Warner, R.C. and G.W. Plaut. 1957b. The preparation of isocitric dehydrogenase from mammalian heart. J. Biol. Chem., 226: 965-975.

Simmonds, R.C., 1970. Lower vertebrate and invertebrate protocol. Lunar receiving laboratory sample biomedical evaluation, NASA MSC 03266, pp. 1-83.

_____, Holland, J.M., Young, E.L. and J.F. Boyd. 1972. Animal maintenance for biomedical evaluation of lunar material. J. Am. Vet. Med. Ass., 161: 720-727.

Smith, P.J., Patchell, G.J. and P.G. Benson, 1979. Glucosephosphate isomerase and isocitrate dehydrogenase polymorphisms in the hake, Merluccius australis. New Zealand J. Mar. and Freshwater Res., 13(4): 545-547.

Somero, G.N., 1969. Enzymic mechanisms of temperature compensation: immediate and evolutionary effects of temperature on enzymes of aquatic poikilotherms. Am. Nat., 103(933): 517-530.

_____, 1975a. "The role of isozymes in adaptation to varying temperatures" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol. II, pp. 221-234, Academic Press, New York.

_____, 1975b. Temperature as a selective factor in protein evolution: the adaptational strategy of "compromise". J. Exp. Zool., 194: 175-188.

_____, 1978. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises Ann. Rev. Ecol. Syst., 9: 1-29.

_____, 1981. pH-temperature interactions on proteins: Principles of optimal pH and buffer system design. Mar. Biol. Lett., 2: 163-178.

Stein, A.M., Kaplan, N.O. and M.M. Ciotti. 1959. Pyridine nucleotide transhydrogenase. VII. Determination of the reactions with coenzyme analogues in mammalian tissues. J. Biol. Chem., 234(4): 979-986.

_____, Stein, J.H. and S.K. Kirkman. 1967. DPN-specific isocitrate dehydrogenase of mammalian mitochondria I. On the roles of pyridine nucleotide transhydrogenase and the isocitric dehydrogenases in the respiration of mitochondria of normal and neoplastic tissues. Biochemistry, 6(5): 1370-1379.

Stellwagen, E., Cass, R., Thompson, S.T. and Woody, M., 1975. Predicted distribution of NAD domain among glycolytic enzymes. Nature, 257: 716-718.

Sudi, J., 1970. Kinetics of the protection of lactate dehydrogenase by substrate against heat inactivation. Biochim. Biophys. Acta, 212: 213-224.

Tager, J.M., 1966. "Nicotinamide nucleotide-linked oxidoreductions in rat liver mitochondria" in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and E.C. Slater, Eds.), Vol.7, pp. 202-217, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Taggart, J., Ferguson, A. and F.M. Mason. 1981. Genetic variation in irish populations of brown trout (Salmo trutta L.): electrophoretic analysis of allozymes. Comp. Biochem. Physiol., 69 B: 393-412.

Tanis, R.J., Ferrell, R.E. and R.E. Tashian. 1973. Substitution of lysine for threonine at position 100 in human carbonic anhydrase Id Michigan. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51: 699-703.

Taniguchi, N. and K-I. Numachi. 1978. Genetic variation of 6-phosphogluconate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and glutamic-oxaloacetic transaminase in the liver of japanese eel. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44(12): 1351-1355.

Taylor, M.H. and L. Di Michele. 1980. Ovarian changes during the lunar spawning cycle of Fundulus heteroclitus. Copeia, 1980(1): 118-125.

_____, Di Michele, L. and G.J. Leach. 1977. Egg stranding in the life cycle of the mummichog, Fundulus heteroclitus. Copeia, 1977: 397-399.

_____, Leach, G.J., Di Michele, L., Levitan, W.M. and W.F. Jacob. 1979. Lunar spawning cycle in the mummichog,

Fundulus heteroclitus (Pisces: Cyprinodontidae). Copeia, 1979(2): 291-297.

Thang, M.N., Drocourt, J.L., Chelbi-Alix, M.K., Thang, D.C., Lubochinsky, J., Ruet, A., Sentenac, A., Gangloff, J. and G. Dirheimer. 1979. "Affinity chromatography of proteins which display high affinity for nucleic acids: use of cibacron-blue dextran and polyribonucleotides immobilized on agarose" in Affinity Chromatography and Molecular Interactions (Egly, J.-M., Ed.), pp. 303-314, Editions INSERM, Paris.

Thillart van den G., Waarde, van A., Dobbe, F. and F. Kesbeke. 1982. Anaerobic energy metabolism of golfish, Carassius auratus (L.). J. Comp. Physiol., 146: 41-49.

Tracey, M.L., Nelson, K., Hedgecork, D., Shleser, R.A. and M.L. Pressick. 1975. Biochemical genetics of lobsters: genetic variation and the structure of american lobster (Homarus americanus) populations. J. Fish. Res. Bd. Can., 32: 2091-2101.

Tucker, V.A., 1968. Respiratory exchange and evaporative water loss in the flying budgerigar. J. Exp. Biol., 48: 67-87.

Turner, B.W., Pettigrew, D.W. and G.K. Ackers. 1981. "Measurements and analysis of ligand-linked subunit dissociation equilibria in human hemoglobins" in Methods in Enzymology (Antonini, E., Rossi-Bernardi, L., and E. Chiancone, Eds.), Vol. 76, pp. 596-628, Academic Press, N.Y.

Uhr, M.L., Thompson, V.W. and W.W. Cleland. 1974. The kinetics of pig heart TPN-isocitrate dehydrogenase. I. Initial velocity, substrate and product inhibition, and isotope exchange studies. J. Biol. Chem., 249(9): 2920-2927.

Umminger, B.L., 1969. Osmotic and ionic regulation in the killifish, Fundulus heteroclitus, at subzero temperatures. Amer. Zool., 9: 588-589.

Utter, F.M., Allendorf, F.W. and B. May. 1979. Genetic basis of creatine kinase isozymes in skeletal muscle of Salmonid fishes. Biochem. Genet., 17: 1079-1091.

Uyeno, T. and R.R. Miller. 1962. Relationships of Empetrichthys erdisi, a Pliocene Cyprinodontid fish from California, with remarks on the Fundulinae and Cyprinodontidae. Copeia, 1962(3): 520-532.

Valiela, I., Wright, J.E., Teal, J.M., and S.B. Volkmann. 1977. Growth, production and energy transformations in the

- salt marsh killifish Fundulus heteroclitus. Mar. Biol., 40: 135-144.
- Van Beneden, R.J., Cashon, R.E. and D.A. Powers. 1981. Biochemical genetics of Fundulus heteroclitus (L.). III. Inheritance of isocitrate dehydrogenase (Idh-A and Idh-B), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-Pgdh-A), and serum esterase (Est-S) polymorphisms. Biochem. Genet., 19: 701-713.
- Vazques, B. and H.C. Reeves. 1979. NADP-specific isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 578: 31-40.
- _____ and H.C. Reeves. 1981. NADP-specific isocitrate dehydrogenase from Escherichia coli. V. Multiple forms of the enzyme. Biochim. Biophys. Acta, 660: 16-22.
- Vessel, E.S., 1975. "Medical uses of isozymes" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol. II, pp. 1-28., Academic Press, N.Y.
- Vickery, H.B., 1962. A suggested new nomenclature for the isomers of isocitric acid. J. Biol. Chem., 237(3): 1739-1741.
- Vignais, P.V. and P.M. Vignais. 1961. Role des di- et tri-phosphopyridine nucleotides dans l'oxydation mitochondriale de l'isocitrate. Biochim. Biophys. Acta., 47: 515-528.
- Walsh, C., 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms. W.W. Freeman and Company, San Francisco, pp. 678-680.
- Wang, H.S. and H.B. Le'John. 1974. Analogy and homology of dehydrogenases of the Oomycetes. III. Isozyme patterns of malic and isocitric dehydrogenases. Can J. Microbiol., 20: 581-586.
- Weisberg, S.B. and V.A. Lotrich. 1982. Ingestion, egestion, excretion, growth, and conversion efficiency for the mummichog, Fundulus heteroclitus (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 62: 237-249.
- White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L. and R.I. Lehman. 1978. Principles of Biochemistry. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- Whitt, G.S., 1969. Homology of lactate dehydrogenase genes: E gene function in the teleost nervous system. Science, 166: 1156-1158.
- _____, 1970a. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. J. Exp. Zool., 175: 1-36.

_____, 1970b. Genetic variation of supernatant and mitochondrial malate dehydrogenase isozymes in the teleost Fundulus heteroclitus, Experientia, 26: 734-736.

_____, Shaklee, J.B. and C.L. Markert. 1975. "Evolution of the lactate dehydrogenase isozymes of fish" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol.IV, pp. 381-400, Academic Press, New York.

Wicken, S.S., Chung, A.E. and J.S. Franzen. 1972. Isocitrate dehydrogenase from Azotobacter vinelandii. Order of substrate addition and product release. Biochemistry, 11(25): 4766-4778.

Williamson, J.H., Krochko, D. and M.M. Bentley. 1980. Properties of Drosophila NADP-isocitrate dehydrogenase purified on procion brilliant blue-sepharose-4B. Comp. Biochem. Physiol., 65 B:339-343.

Wills, G.J., 1975. "Selective pressures on isozymes in Drosophila" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol. IV, pp. 517-532, Academic Press, New York.

Wilson, J.E., 1976. Applications of blue dextran and cibacron blue F3GA in purification and structural studies of nucleotide-requiring enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72: 816-823.

Wilson, T.L., 1977a. Interrelations between pH and temperature for the catalytic rate of the M₄ isozyme of lactate dehydrogenase from goldfish Carassius auratus L., Arch. Biochem. Biophys., 179: 378-390.

_____, 1977b. Theoretical analysis of the effects of two pH regulation patterns on the temperature sensitivities of biological systems in nonhomeothermic animals. Arch. Biochem. Biophys., 182: 409-419.

Wilson, F.R., Champion, J.M., Whitt, G.S. and C.L. Prosser. 1975. "Isozyme patterns in tissues of temperature-acclimated fish" in Isozymes (Markert, C.L., Ed.), Vol II. pp. 193-206, Academic Press, New York.

Wohlschlag, D.E., 1964. "Respiratory metabolism and ecological characteristics of some fishes in Mc Murdo Sound, Antarctica" in Biology of the Antarctic Sea. (Lee, O.M., Ed.), Vol.I, pp. 33-62, American Geophysical Union, Washington, D.C.

Wright, G.E., May, B., Stoneking, M. and G.M. Lee. 1980. Pseudolinkage of the duplicate loci for supernatant aspartate aminotransferase in brook trout (Salvelinus fontinalis), J. Hered., 71: 223-228.

Ya.Kon', I. and L.I. Shirina. 1981. Vitamin A and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase: differences in action on mitochondrial and cytoplasmic isoenzyme fractions. Biokhimiya, 46(5): 789-796.

Yancey, P.H. and G.N. Somero. 1978. Temperature dependance of intracellular pH: its role in the conservation of pyruvate apparent Km values of vertebrate lactate dehydrogenases. J. Comp. Physiol., 125: 129-134.

Yong, H.S., Chan, K.L., Mak, C. and S.S. Dhaliwal. 1981. Isocitrate dehydrogenase gene duplication and fixed heterophenotype in the cultivated soybean Glycine max. Experientia, 37: 130-131.

Yoshida, A., 1975. "Evolution of Glucose 6- phosphate dehydrogenase and hexose 6- phosphate dehydrogenase" in Isozymes (Markert, C.L., ED.), Vol.IV, pp. 853-866, Academic Press, New York.