



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Influencia del estrés salino sobre la
glutamato deshidrogenasa NAD^+
dependiente de *Debaryomyces hansenii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
LUIS ERNESTO FLORES CORONA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

VOCAL: Dr. José de Jesús García Trejo

SECRETARIO: Dr. Antonio Calvin Peña Díaz

1er. SUPLENTE: Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

2° SUPLENTE: Dra. Aurora Lara Nuñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 306 oriente,
departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología de Celular.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ANTONIO CALVIN PEÑA DÍAZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. NORMA SILVIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUSTENTANTE:

LUIS ERNESTO FLORES CORONA

Este proyecto fue realizado bajo el estímulo económico otorgado por el SNI, con el nombramiento de Ayudante de Investigador Emérito, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Expediente 9428.

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	MARCO TEÓRICO	4
3.1	Transporte de iones y producción de solutos compatibles	4
3.2	Metabolismo anaerobio y aerobio.....	6
3.3	Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno	8
3.4	Descripción general de las deshidrogenasas	10
3.4.1	Glutamato deshidrogenasa.....	11
3.4.1.1	GDH-NADP ⁺ y GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i>	12
3.4.1.2	Efecto de los esteroides e influencia de la concentración de NADH en la GDH	13
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
5.	HIPÓTESIS	16
6.	OBJETIVOS	17
6.1	Objetivo general	17
6.2	Objetivos particulares	17
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL	18
7.1	Cepas, medios y condiciones de cultivo	18
7.2	Extractos libres de células	18
7.3	Determinación de proteína por el método de Lowry	19
7.4	Ensayos de actividad enzimática de la GDH-NAD ⁺	20
7.4.1	Generalidades	20
7.4.1.1	Reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato	22
7.4.1.1.1	Variación de las concentraciones de NADH.....	22
7.4.1.1.2	Efecto de las sales de fosfato.....	22
7.4.1.1.3	Efecto de las sales de cloruro.....	23
7.4.1.2	Reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato	23
7.4.1.2.1	Efecto de las sales de fosfato.....	23
7.4.1.3	Efecto del ADP en ambos sentidos de la reacción de la GDH-NAD ⁺	24
7.4.1.4	Determinación de la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD ⁺	25

8.	RESULTADOS	26
8.1	Reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato	26
8.1.1	Efecto de la concentración de NADH sobre la actividad de la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i>	26
8.1.2	Inhibición de la actividad de la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i> y <i>S. cerevisiae</i> por fosfato de sodio y fosfato de potasio	27
8.1.3	Inhibición de la actividad de la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i> y <i>S. cerevisiae</i> por cloruro de sodio y cloruro de potasio.....	30
8.2	Reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato.....	32
8.2.1	Inhibición de la actividad de la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i> y <i>S. cerevisiae</i> por fosfato de sodio y fosfato de potasio	33
8.3	Efecto del ADP en ambos sentidos de la reacción de la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i>	34
8.4	Actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD ⁺ de <i>D. hansenii</i>	37
9.	DISCUSIÓN	40
9.1	Cooperatividad negativa.....	40
9.2	La inhibición por las sales parece ser un efecto meramente químico.	40
9.3	El ADP puede actuar como activador o inhibidor.	43
9.4	Promiscuidad enzimática.....	43
9.5	Comparación filogenética entre levaduras y organismos superiores.....	44
10.	CONCLUSIONES	47
11.	PERSPECTIVAS	47
12.	BIBLIOGRAFÍA	48



1. ABREVIATURAS

AlaDH	Alanina deshidrogenasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADP	Adenosíndifosfato
ATP	Adenosíntrifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
DES	Dietilestilbestrol
FAD	Flavínadenín nucleótido
GDH-NAD ⁺	Glutamato deshidrogenasa NAD ⁺ dependiente
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
ICL	Isocitrato liasa
IDH-NAD ⁺	Isocitrato deshidrogenasa NAD ⁺ dependiente
IDH-NADP ⁺	Isocitrato deshidrogenasa NADP ⁺ dependiente
LDH	Lactato deshidrogenasa
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
MS	Malato sintasa
N ₂	Nitrógeno molecular
NAD ⁺	Nicotínadeníndinucleótido (Oxidado)
NADH	Nicotínadeníndinucleótido (Reducido)
NADPH	Nicotínadeníndinucleótido fosfato (Reducido)
NO ₂ ⁻	Ión nitrito
NO ₃ ⁻	Ión nitrato
PFK	Fosfofructocinasa
Pi	Fosfato inorgánico
PO ₄ ³⁻	Ión fosfato
rpm	revoluciones por minuto
SDH	Succinato deshidrogenasa
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TEA	Trietanolamina
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> , medio de cultivo



2. INTRODUCCIÓN

Las levaduras han existido en nuestro planeta desde tiempos muy remotos, formando parte del desarrollo de los seres humanos, a través de la producción de cerveza, vino y pan, en la actualidad son muy útiles en la investigación científica, siendo pieza fundamental en aplicaciones biotecnológicas.

Uno de estos microorganismos es *Debaryomyces hansenii*, el cual se encuentra clasificado taxonómicamente como un hemiascomiceto. Fue aislado por primera vez del océano; aunque también se puede encontrar en salmueras, quesos, productos lácteos y embutidos, cuenta con la capacidad de aprovechar diversas fuentes de carbono, así como crecer a bajas temperaturas, pH elevado y ambientes con concentraciones elevadas de cloruro de sodio.

Esta última característica ha generado en la comunidad científica divergencias, ya que algunos intelectuales lo consideran como halotolerante, otros como halófilo, y otros más como eurihalino. Esta cualidad de *D. hansenii* se debe a múltiples mecanismos de respuesta al estrés salino, entre los que se encuentran sistemas de transporte e intercambio de iones como: una H⁺P-ATPasa funcional que realiza el bombeo de protones, lo cual genera una diferencia en el potencial de membrana y es aprovechado para transportar sodio o potasio a través de un uniportador, un sistema intercambiador de K⁺/H⁺, y un posible intercambiador catión/catión; además, algunos de estos sistemas de transporte generan la acumulación de sodio, sin efectos aparentes de toxicidad. Otro mecanismo de respuesta es la producción de solutos compatibles como el arabinol y el glicerol, cuya función es restaurar la turgencia intracelular, proteger a las enzimas y estabilizar las membranas. Debido a esto se han realizado varios estudios para caracterizar su metabolismo en presencia y ausencia de sal, analizándose diversas enzimas. Se sabe que *D. hansenii* tiene poca actividad fermentativa en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*; en cuanto su actividad oxidativa, se encontró que en presencia de sal se activa el ciclo del glioxilato, lo que produce un aumento en su capacidad de respiración (Sánchez *et al.*, 2008). Además en este mismo artículo, se observó un decremento de la actividad de la glutamato deshidrogenasa NAD⁺ dependiente en células crecidas con NaCl en comparación con los cultivos adicionados



con KCl. Otro dato importante es que las células crecidas con sal muestran un aumento en los niveles de PO_4^{3-} intracelular.

El propósito de esta investigación consistió en analizar el comportamiento de la GDH-NAD⁺ en presencia de distintas sales por medio de ensayos *in vitro*, ya que esta enzima es parte fundamental en la asimilación de amonio, en colaboración con otra vía llamada GS/GOGAT, para la posterior formación de aminoácidos y nucleótidos a través de distintas rutas biosintéticas.

La salinización de los suelos se ha vuelto un grave problema para la agricultura como consecuencia de la sobreexplotación en regadíos, lo cual provoca la acumulación lenta de sales, y la entrada de agua de mar en los acuíferos de las zonas costeras. Debido a esto, se busca producir plantas transformadas resistentes a altas concentraciones de sal. Para lograrlo se pretende encontrar genes claves de una levadura tolerante al estrés salino como *D. hansenii*. Estos genes podrían servir para realizar la transformación en plantas y así obtener cepas halotolerantes, logrando grandes beneficios en este sector.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Transporte de iones y producción de solutos compatibles.

Una de las primeras investigadoras que realizó investigaciones en *D. hansenii* fue Norkrans. (1968). encontró que esta levadura podía crecer en medios con concentraciones de hasta 4.1 M de NaCl, pH de 8.5 y una temperatura de 6 °C, sin alterarse sus principales funciones metabólicas: la respiración y la fermentación (Neves *et al.*, 1997). Al continuar con las investigaciones Norkrans y Kylin. (1969) encontraron que *D. hansenii* puede incorporar altas concentraciones de Na⁺, y que esto se ve influenciado por la concentración de K⁺.

D. hansenii, siendo capaz de crecer bajo condiciones de salinidad, resiste la alta osmolaridad presente en su hábitat. Norkrans y Kylin. (1969) hallaron que al igual que otros microorganismos halotolerantes, *D. hansenii* sintetiza y acumula moléculas orgánicas pequeñas denominadas solutos compatibles en presencia de sal, cuya función es restaurar la turgencia intracelular, proteger a las enzimas y estabilizar las membranas. Sin embargo, observaron que esta levadura también es capaz de acumular grandes cantidades de cationes como el Na⁺ y el K⁺ sin efectos de toxicidad. Los dos principales polioles producidos por *D. hansenii* como respuesta al estrés salino son el glicerol, que predomina durante la fase logarítmica de crecimiento y el arabinitol, que se genera primordialmente en la fase estacionaria de crecimiento (Adler y Gustafsson, 1980).

Un área de investigación importante en la halotolerancia de *D. hansenii* es la identificación de los sistemas de transporte en respuesta al estrés salino. Lucas *et al.* (1990) sugirieron la existencia de un cotransportador glicerol/Na⁺ que también podría contribuir a la internalización de cationes (Fig. 1). Además, se ha demostrado la presencia de una H⁺-ATPasa tipo P, similar a la codificada por el gen PMA1 de *S. cerevisiae*, que genera una diferencia de potencial en la membrana celular y un gradiente de pH debido a la expulsión de protones al medio (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). Por otra parte Almagro *et al.* (2001) plantearon que la diferencia de potencial transmembranal permite la incorporación de Na⁺ y/o K⁺ por medio de uno o más uniportadores; también se sabe que el Na⁺ puede ser expulsado por dos Na⁺-ATPasas codificadas por los genes *DhENA1* y *DhENA2*. Se sugiere que a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae*, las



proteínas Enap en *D. hansenii* no determinan la extrusión de grandes concentraciones de Na^+ , pero podrían desempeñar un papel importante en el mantenimiento del equilibrio en los niveles de los cationes intracelulares, asegurando la homeostasis iónica de la célula.

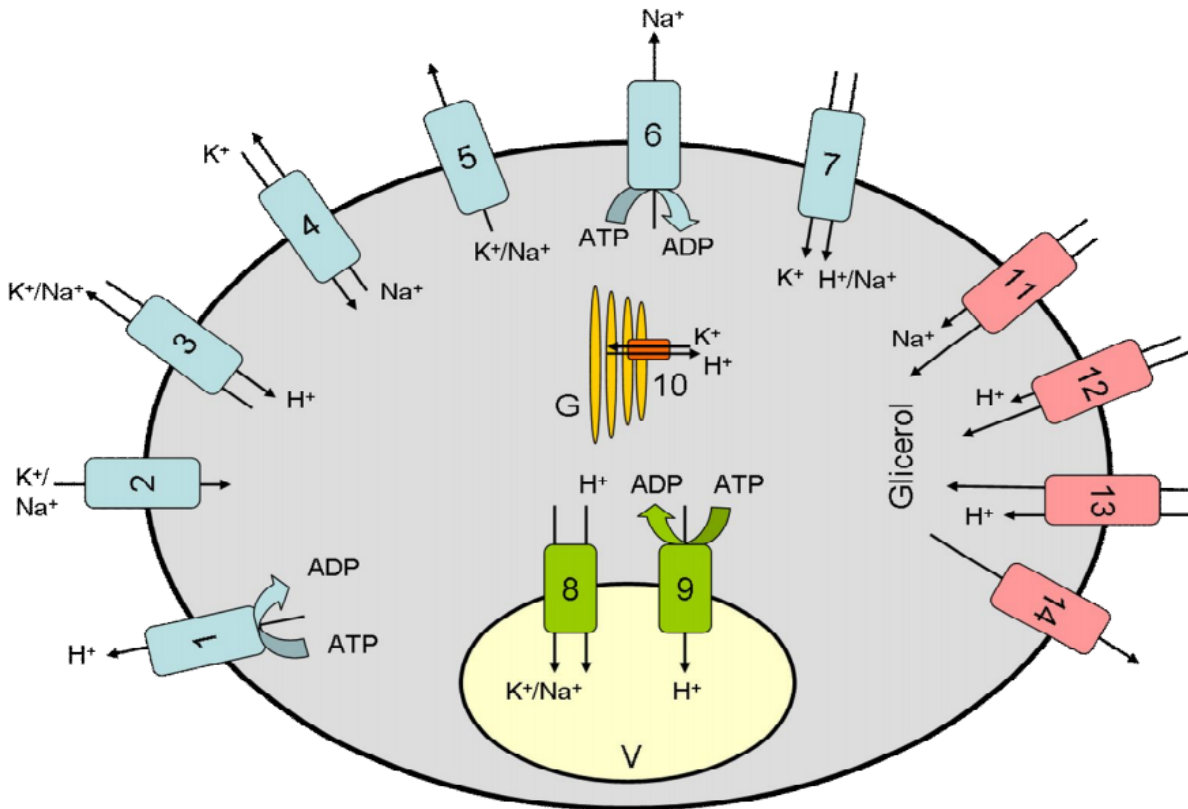


Figura 1. Sistemas de transporte para el equilibrio osmótico en *D. hansenii*. No. 1, H^+ P-ATPasa similar a Pma1p (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). No. 2, uniportador equivalente a Trk1p de *S. cerevisiae* (Prista *et al.*, 2007). No. 3, Antiportador Nha1. No. 4, posible intercambiador catión/catión (Prista *et al.*, 1997). No. 6, Na^+ -ATPasa codificada por el gen ENA1 (Almagro *et al.*, 2001). No. 11, transportador propuesto por Lucas *et al.* 1990. V: vacuola; G: aparato de Golgi. Tomada de Sánchez (2014).



3.2 Metabolismo anaerobio y aerobio.

Se han estudiado los distintos mecanismos que *D. hansenii* utiliza como respuesta al estrés salino; también es importante saber qué sucede con el metabolismo aerobio y anaerobio de esta levadura. Sánchez *et al.* (2006) analizaron la vía glucolítica de *D. hansenii* comparándola con *S. cerevisiae* en ausencia de sal. Se encontró una baja actividad fermentativa en *D. hansenii*, debido a la disminución de la actividad enzimática de varias enzimas de esta vía, pero el principal motivo de esto parece ser la menor actividad de la fosfofructocinasa (PFK). Calahorra *et al.* (2009) descubrieron que la producción de etanol aumenta en *D. hansenii* al crecerla con 1 M de KCl o NaCl, debido al aumento de las actividades de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la PFK.

Por otra parte, Sánchez *et al.* (2008) encontraron cambios del metabolismo aerobio, que implican al ciclo de Krebs y la respiración, haciendo crecer las células y/o incubándolas en ausencia o presencia de 1 M de KCl o NaCl, con el fin de detectar diferencias en la producción de intermediarios metabólicos y en las actividades enzimáticas de estas vías.

A continuación se hace un resumen de los datos obtenidos durante esta última investigación: 1) Al crecer las células en presencia de 1 M de KCl o NaCl, se encontraron variaciones en algunos intermediarios del ciclo de Krebs; altos niveles de succinato, decremento de los niveles de isocitrato y de malato. 2) Al encontrar altos niveles de succinato en presencia de sal, se determinaron las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo del glioxilato además de las del ciclo de Krebs. Las principales diferencias de las células crecidas en presencia de sal fueron: una disminución en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (IDH-NAD⁺) y de la IDH-NADP⁺; aumento de la isocitrato liasa (ICL) y la malato sintasa (MS), las cuales pertenecen al ciclo del glioxilato; un aumento moderado de la succinato deshidrogenasa (SDH), congruente con los elevados niveles de succinato (Fig. 2).

Los altos niveles de succinato, el aumento de la ICL y la MS, así como el marcado decremento de las IDH, parecen inducir un cambio en el metabolismo aeróbico de *D. hansenii* durante el estrés salino, favoreciendo el ciclo del glioxilato. Por lo tanto, recapitulando los resultados anteriores, al activarse este ciclo, se genera una mayor cantidad de succinato, el cual es aprovechado simultáneamente por el ciclo de Krebs,



para de esta manera obtener una gran cantidad de poder reductor (FADH_2) a través de la SDH, el cual es aprovechado por el complejo II de la cadena transportadora de electrones. Esto explicaría el por qué *D. hansenii* muestra un incremento en la capacidad respiratoria, cuando las células son crecidas en presencia de sal.

Neves *et al.* (1997) señalaron anteriormente que la sensibilidad de las enzimas a las sales se debe medir utilizando fosfato, y no cloruro, debido a que el PO_4^{3-} es el principal anión intracelular. Otros experimentos alternos, usando Na^{35}Cl o K^{35}Cl , demostraron que el Cl^- no es capaz de transportarse al interior de *D. hansenii*. Estos resultados se extienden a (Coury *et al.*, 1999) quienes informaron que este anión no es absorbido por *S. cerevisiae*. Debido a esto, Sánchez *et al.* (2008) decidieron medir la acumulación de Pi en células crecidas en medio YPD sin sal, o con 1 M de NaCl o KCl; los experimentos mostraron un elevado nivel de Pi al crecer las células en presencia de sal, observándose una mayor cantidad al crecerlas en NaCl.

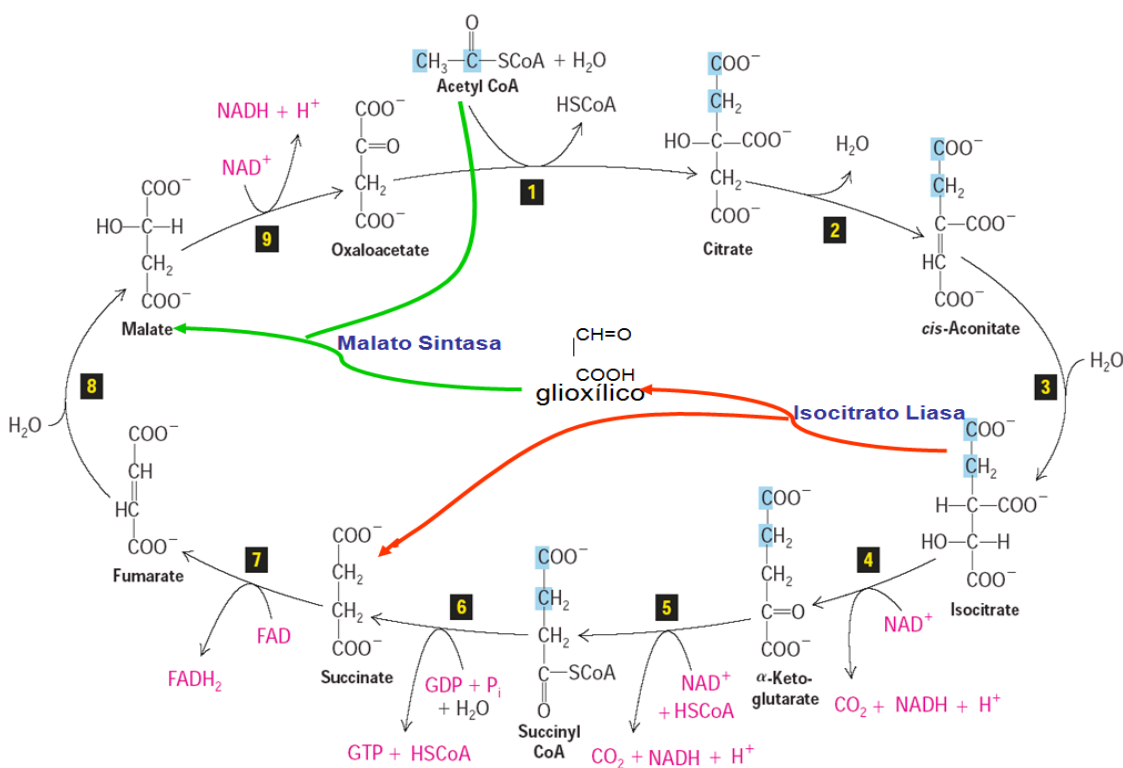


Figura 2. Activación del ciclo de glioxilato de *D. hansenii* bajo estrés salino; se muestra el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. (1) citrato sintasa; (2) y (3) aconitasa; (4) isocitrato deshidrogenasa; (5) complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa; (6) succinilCoA sintetasa; (7) succinato deshidrogenasa; (8) fumarasa; (9) malato deshidrogenasa.



3.3 Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno.

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y a los ácidos nucleicos comparten la necesidad de nitrógeno. Por lo general, los compuestos de nitrógeno solubles y utilizables biológicamente escasean en el entorno natural. El N_2 es el componente más abundante que se puede encontrar en el aire; a pesar de ello, pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables para los organismos vivos, esto es a partir del ciclo del nitrógeno. El primer paso de este ciclo consiste en la fijación o reducción del N_2 por bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter vinelandii*, a través del complejo de la nitrogenasa, el cual está compuesto por la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa, las cuales producen NH_4^+ . Aunque este compuesto ya puede ser utilizado por la mayor parte de los organismos vivos, ciertas bacterias que abundan en el suelo, suelen utilizar el NH_4^+ antes producido y oxidarlo a NO_2^- y finalmente a NO_3^- , este proceso se conoce como nitrificación. Las plantas y bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente el NO_3^- y NO_2^- por acción de las nitrato y nitrito reductasas. El NH_4^+ que se obtiene de este proceso, se incorpora a los aminoácidos en el caso de las plantas. Los animales herbívoros usan a su vez las plantas como fuente de aminoácidos, para producir proteínas. Cuando los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo, donde bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo a NO_2^- y NO_3^- . Las bacterias que convierten el NO_3^- en N_2 en condiciones anaeróbicas mantienen un equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico; a este proceso se le denomina desnitrificación.

El nitrógeno reducido en forma de NH_4^+ es incorporado primero a los aminoácidos y posteriormente a otras biomoléculas que contienen nitrógeno. Dos aminoácidos, glutamato y glutamina, constituyen un punto crítico de entrada. El glutamato es la fuente de grupos amino de la mayor parte de los aminoácidos, a través de reacciones de transaminación, y el nitrógeno del grupo amida de la glutamina es la fuente de grupos amino para una amplia gama de procesos biosintéticos. En la mayoría de tipos celulares, y de fluidos extracelulares en los organismos superiores, uno o ambos aminoácidos están presentes en concentraciones más elevadas, a veces un orden de magnitud o más, que los otros aminoácidos (Nelson, 2007).



Existen dos rutas biosintéticas para la incorporación de NH_4^+ (Fig. 3):

Una de ellas requiere dos reacciones. La glutamina sintetasa (GS) cataliza la reacción del glutamato y el NH_4^+ para formar glutamina. La producción de glutamato se da a partir de la glutamina generada anteriormente, en una reacción catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT). El α -cetoglutarato, intermediario del ciclo de Krebs, experimenta una aminación reductora, utilizando a la glutamina como donador de nitrógeno.

Por otra parte el glutamato también se puede formar por otra vía: la reacción del α -cetoglutarato y el NH_4^+ para formar glutamato en un sólo paso a través de la GDH- NAD(P)^+ . Esta reacción necesita como coenzimas NADP^+ o NAD^+ , que en su forma reducida proporcionan poder reductor.

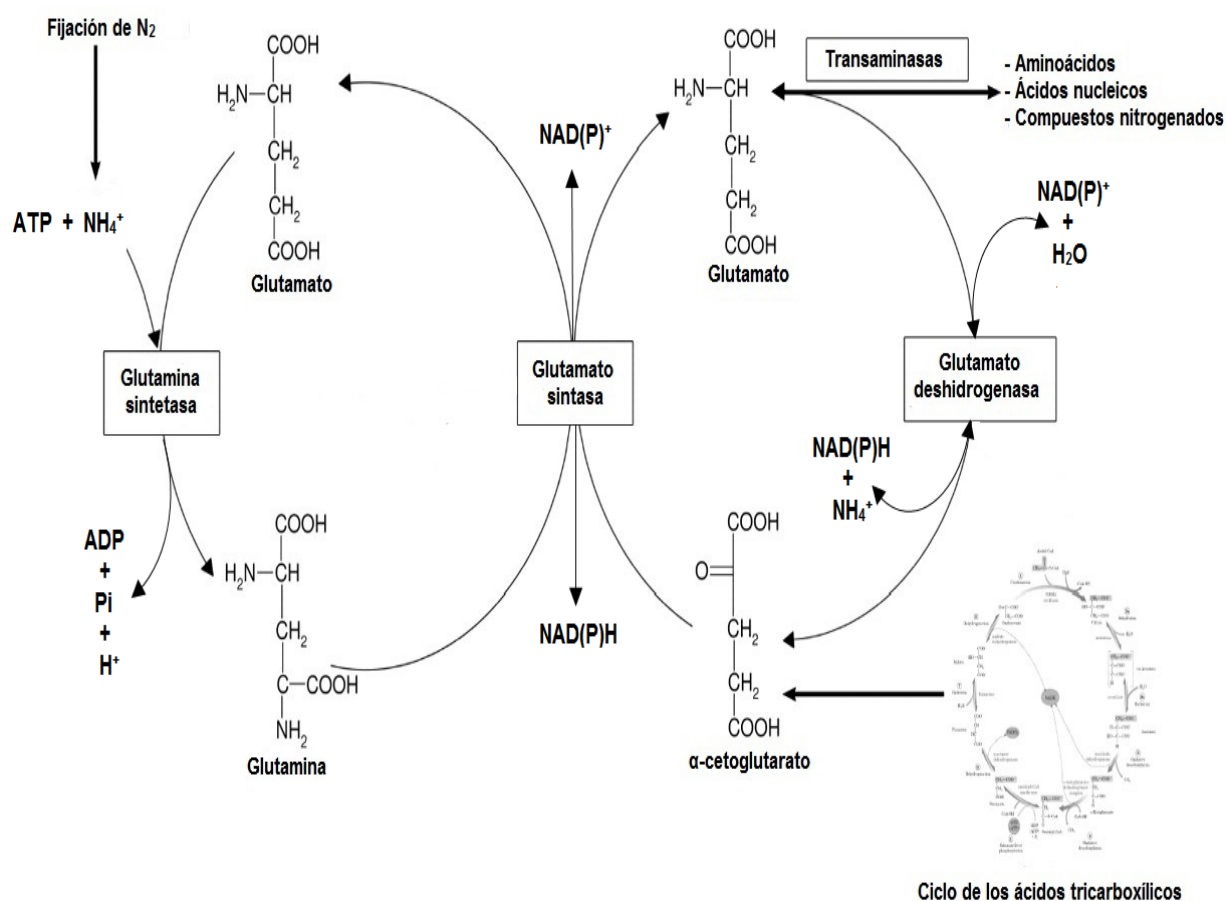


Figura 3. Rutas biosintéticas para la incorporación de NH_4^+ para la formación de aminoácidos y ácidos nucleicos: GDH- NAD(P)^+ , lado derecho; GS/GOGAT, lado izquierdo. Modificada de Raymond (2005).



3.4 Descripción general de las deshidrogenasas.

Las deshidrogenasas de aminoácidos son una familia de enzimas que forman parte de la superfamilia de las oxidoreductasas. Generalmente son enzimas oligoméricas, con un solo tipo de subunidad. Cada subunidad presenta dos dominios, en uno de ellos se encuentra el centro de unión para la coenzima y en el otro el de sustrato. Entre ambos dominios hay un espacio en donde tiene lugar la transferencia de electrones entre sustrato y coenzima.

Normalmente los dominios en los que se encuentra el centro activo para el sustrato no se parecen cuando se comparan los de dos deshidrogenasas distintas, pero por el contrario, sí se parecen extraordinariamente los dominios de unión para la coenzima.

Las deshidrogenasas pueden ser de dos tipos: las dependientes de nucleótidos de nicotinamida, que necesitan NAD^+ o NADP^+ como coenzima, y las deshidrogenasas flavín dependientes que contienen FAD como grupo prostético.

Las deshidrogenasas dependientes de nicotinamida suelen ser específicas para cada una de las coenzimas, NAD^+ o NADP^+ , siendo pocas las que actúan bien con ambas coenzimas. En general, las deshidrogenasas que utilizan NAD^+ como coenzima, son catabólicas, producen energía e intervienen principalmente en el catabolismo, mientras que las que utilizan NADP^+ participan principalmente en la transferencia de electrones desde los intermediarios del catabolismo hasta los intermediarios de la biosíntesis (Sund, 1968).

Las deshidrogenasas de aminoácidos son importantes por intervenir en el metabolismo del carbono y el nitrógeno antes de que el esqueleto carbonado de un aminoácido pueda ser metabolizado para la obtención de energía en la glucólisis o el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). El grupo amino debe ser transferido, mediante transaminasas, que transfieren el grupo amino de un aminoácido a otro; el más común es el glutamato. Una segunda modalidad emplea desaminasas, como fenilalanina-amonioliasa o la aspartasa, que no cambian el nivel de oxidación del sustrato. Por último, una tercera opción es el empleo de deshidrogenasas de aminoácidos. La ventaja que presentan estas enzimas es que el NH_4^+ que se transfiere lo hacen como amonio libre y puede ser utilizado por la célula en varias vías. Además, la desaminación se acopla a la



reducción de un nucleótido que puede ser utilizado en una variedad de procesos energéticos.

3.4.1 Glutamato deshidrogenasa.

Las enzimas pueden diferenciarse por la inducción y represión de su síntesis por metabolitos o regulación de la actividad por nucleótidos de purina di y trifosfatados (Smith *et al.*, 1975). A la GDH-NAD⁺ se le asigna un papel catabólico, mientras que a la GDH-NADP⁺ se le ha implicado en la síntesis de glutamato (Sanwal y Lata, 1961).

Todas las GDH que se conocen hasta ahora son oligoméricas, y dependiendo del tamaño de la subunidad pueden ser clasificadas en los siguientes grupos estructurales: GDHs hexaméricas (seis subunidades idénticas de aproximadamente 50 kDa) y las GDHs tetraméricas de 115 kDa. El grupo de las hexaméricas incluye las GDHs de la mayoría de las especies bacterianas conocidas (Rice *et al.*, 1985), las GDH-NADP⁺ de eucariotes inferiores (Kinnaird y Fincham, 1983) las GDH-NAD(P)⁺ duales de vertebrados (Nakatani *et al.*, 1988). En el grupo de las tetraméricas se incluyen las GDH-NAD⁺ encontradas en eucariotes inferiores (Kinnaird y Fincham, 1983).

De acuerdo con la base de datos “Genolevures.org”, la cual proporciona datos y clasificaciones de secuencias genómicas de las dieciocho especies de levaduras hemiascomicetos, la cepa CBS76 de *D. hansenii* cuenta con siete cromosomas; en el cromosoma Deha2C, se encuentran dos genes, *DEHA2C10054g* y *DEHA2C17204g*, y cada uno expresa una isoenzima similar a la glutamato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*. El primer gen expresa a la GDH-NAD⁺, que es similar a la GDH2 de *S. cerevisiae*, y el segundo expresa a la GDH-NADP⁺ que es similar a la GDH1 de *S. cerevisiae*.

Se ha demostrado que en varias bacterias, el glutamato se acumula para actuar como un osmolito. Al cultivar *Salmonella typhimurium* en 0.5 M NaCl, la concentración de glutamato aumenta tres veces en comparación con la que se encuentra sin sal (Botsford *et al.*, 1994). *Rhizobium meliloti* también es capaz de acumular glutamato durante el estrés osmótico (Botsford y Lewis, 1990). Sin embargo, no se ha demostrado que la acumulación de glutamato sea el resultado del aumento de las actividades de GDH-NAD(P)⁺ ni de GOGAT; es más bien debida a la acción de otras enzimas implicadas en



su metabolismo (Botsford *et al.*, 1994). Al crecer a *D. hansenii* en presencia de 1 M de KCl o NaCl, los niveles de glutamato no se modifican; al parecer este aminoácido no actúa como osmoprotector en esta levadura (Sánchez *et al.*, 2008).

El efecto del Na⁺ y el K⁺ en la actividad de la GDH de hígado de rata, a través de sales de fosfato, sulfato y cloruro, fue observado por primera vez por Peña *et al.* (1963). Observaron una alta actividad en presencia de fosfato de sodio con respecto a la actividad en presencia de fosfato de potasio; sin embargo, la actividades con las otras sales fueron menores que con fosfato.

3.4.1.1 GDH-NADP⁺ y GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*.

Un análisis comparativo demostró que la actividad de la GDH-NADP⁺ de *D. hansenii*, al ser cultivada en presencia de 1 M de NaCl, fue cinco veces mayor en comparación con el crecimiento en medios sin sal. Sin embargo, la sensibilidad de esta isoenzima se vio disminuida por el efecto de la fuerza iónica al compararla con dos de las isoenzimas de *S. cerevisiae* dependientes de NADP⁺ (GDH1 y GDH3); debido a esto, Alba-Lois *et al.* (2004) sugieren que el aumento de la actividad de la GDH-NADP⁺ cuando esta levadura se cultiva en presencia de NaCl, no necesariamente se debe a una estimulación por la sal, sino que se debe a un aumento en la expresión del gen causante de la síntesis de esta la enzima.

Esta última idea la retomaron Guerrero *et al.* (2005) al realizar un análisis de la expresión de los genes *DhGDH1*, que expresa a la GDH-NADP⁺, y el gen *DhGLN1* que expresa a la GS, en diferentes concentraciones de NaCl. Como primer experimento midieron la actividad enzimática de Gdh1p en cepas silvestres de *D. hansenii* Y7426 y *S. cerevisiae*, así como en cepas mutadas en *gdh1Δ*, *gdh3Δ* de *S. cerevisiae* sin transformar y transformadas con *DhGDH1*. Observaron que la actividad de Gdh1p en las cepas silvestres se manifiesta de forma inversa en presencia de 0.6 M de NaCl; en *D. hansenii* aumenta, mientras que en *S. cerevisiae* silvestre y en la mutante *gdh1Δ*, *gdh3Δ* de *S. cerevisiae* transformada con *DhGDH1* disminuye. Al parecer la disminución de esta enzima en la cepa transformada se debe a cierta sensibilidad al sodio. Por otra parte, encontraron que el transcrito de *DhGDH1* aumenta a partir de una concentración de 0.6



M de NaCl, y que esta expresión aumenta hasta cinco veces en presencia de 2 M de esta sal, con respecto a un control sin sal, sin embargo la expresión de *DhGLN1* disminuye en presencia de 0.6 M de NaCl.

Guerrero y colaboradores consideraron que la disminución de la actividad de Gdh1p expresada en *S. cerevisiae* durante estrés salino, y el aumento en la expresión de *DhGDH1* al incrementar la concentración de NaCl en el medio, refuerza lo antes mencionado por Alba-Lois *et al.* (2004), en cuanto a que es necesario el aumento de la expresión de este gen, para aumentar la actividad de Gdh1p y así disminuir el efecto de inhibición por sodio.

Recientemente se han realizado investigaciones en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* comparándola con *S. cerevisiae* (Sánchez *et al.*, 2008); se ha encontrado que las actividades de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* como la de *S. cerevisiae* incubadas previamente en ausencia de sal, son muy similares. Además, prácticamente no hay ningún cambio en la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*, en células cultivadas en presencia de 1 M de KCl, pero sí una clara disminución de las cultivadas en 1 M de NaCl.

3.4.1.2 Efecto de los esteroides e influencia de la concentración de NADH en la GDH.

Como contraste, a finales de los años 50's Tomkins y colaboradores, encontraron que en una variedad de tejidos de mamíferos, así como en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces fragilis*, la reducción del NAD⁺ se inhibía marcadamente al estar en contacto con bajas concentraciones de algunos esteroides hormonales (Yielding y Tomkins, 1959). Al estudiar esta coenzima vital para que se lleven a cabo reacciones de algunas deshidrogenasas; realizaron investigaciones en la GDH de hígado de res y de extractos mitocondriales de hígado de rata; probaron que esta enzima es inhibida por esteroides y por dietilestilbestrol (DES); sin embargo, al agregar ADP a la reacción, esta inhibición se revierte.

Más tarde, al seguir con las investigaciones en la GDH de organismos superiores, encontraron que se podía disgregar en cuatro subunidades de 250 kDa al entrar en



contacto con estradiol, progesterona o elevadas concentraciones de NADH; sin embargo, este efecto se podía prevenir al agregar ADP (Frieden, 1959; Yielding *et al.*, 1960). Las subunidades producidas por la disgregación de la GDH al entrar en contacto con los esteroides, catalizan la reacción de L-alanina deshidrogenasa (Tomkins *et al.*, 1965).

Existe mucha semejanza entre la L-AlaDH y la GDH, ya que en la reacción que catalizan tienen NH_4^+ como sustrato (Fig. 4); además poseen un pH óptimo alcalino. No obstante, existen algunas diferencias entre ambas deshidrogenasas. La GDH utiliza como catalizador ácido-base una lisina en su centro activo, y la L-AlaDH utiliza un residuo de histidina (Rife y Cleland, 1980).

La L-AlaDH se ha purificado en diferentes especies de *Bacillus*, teniendo un papel importante en la formación de esporas (O'Connor y Halvorson, 1961). Parece que su función en la germinación de las esporas es la producción de energía, directamente a través de la formación de poder reductor o indirectamente por medio de la generación de piruvato (Siranosian *et al.*, 1993).

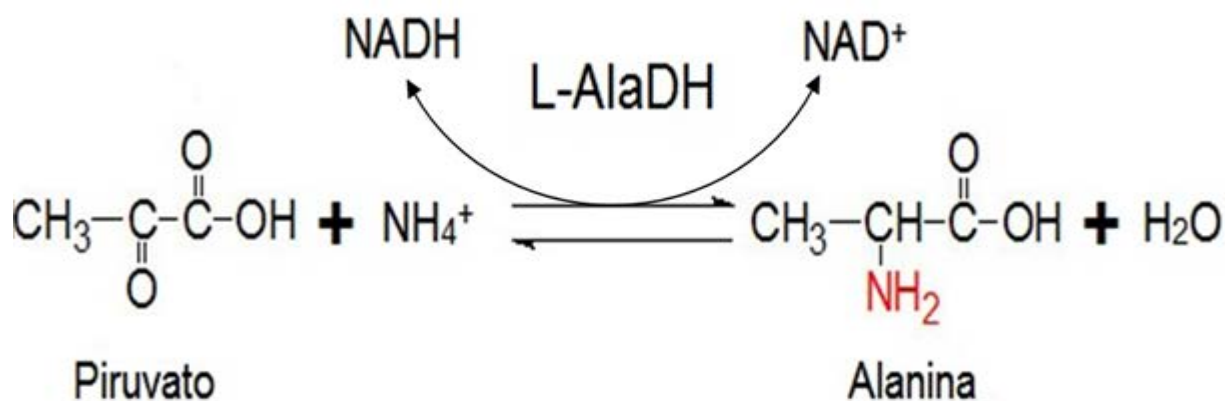


Figura 4. Reacción enzimática de la L-AlaDH.

En el caso de enzimas provenientes de bacterias halófilas extremas, la L-AlaDH de *Halobacterium halobium* muestra requerimientos inusuales de cationes monovalentes para su total actividad. Esta enzima muestra una actividad máxima en la reacción de aminación reductiva con una concentración de 4.3 M de NaCl, la activación puede



llevarse a cabo también por KCl y otras sales. Sin embargo, no se observó actividad en el sentido inverso de la reacción en presencia de Na^+ , pero sí en presencia de K^+ (Keradjopoulos y Holldorf, 1979).

Como ya se había mencionado la base de datos “Genolevures.org”, cuenta con las secuencias genómicas de *D. hansenii*, y al indagar en dichos genes, no se encontró que esta levadura tenga en su genoma el gen que expresa a la L-AlaDH.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al parecer *D. hansenii* cuenta con la capacidad de ajustar distintos mecanismos que le permiten contender con medios salinos, modificando su fisiología y algunas rutas metabólicas. Los trabajos reportados anteriormente sobre *D. hansenii* manifiestan la necesidad de realizar un mayor número de investigaciones enfocadas a los aspectos bioquímicos y moleculares de los mecanismos de osmo-regulación y halotolerancia. Debido a lo anterior, los estudios presentes pretenden ayudar a entender mejor una de las rutas biosintéticas para la incorporación de amonio, para la producción de aminoácidos y ácidos nucleicos, bajo estrés salino en *D. hansenii*.

5. HIPÓTESIS

D. hansenii al ser clasificada como una levadura halotolerante, posee enzimas específicas que se estimulan con altas concentraciones de sal, que le han permitido vivir en ambientes salinos, por lo tanto, al determinar la actividad enzimática de la GDH-NAD⁺ dependiente en presencia de sal, es muy probable que se active.



6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general.

El propósito de esta investigación es analizar el comportamiento de la GDH-NAD⁺ dependiente de la levadura marina *D. hansenii* cepa Y7426, en presencia de sales de cloruros y fosfatos de sodio y potasio por medio de ensayos *in vitro*.

6.2 Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de la concentración de NADH en la reacción enzimática de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia o ausencia de las distintas sales.
- Comparar la reacción enzimática de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* con *S. cerevisiae* en presencia o ausencia de sales de fosfato.
- Comparar la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* con *S. cerevisiae* en presencia o ausencia de sales de cloruro.
- Comparar la reacción enzimática de desaminación oxidativa de L-glutamato de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* con *S. cerevisiae* en presencia o ausencia de sales de fosfato.
- Evaluar el efecto de ADP en ambos sentidos de la reacción enzimática de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia o ausencia de las distintas sales.
- Determinar si existe actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ en presencia de las distintas sales.



7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa de *Debaryomyces hansenii* Y7426 donada por el *US Department of Agriculture*, Peoria, Illinois, EUA. Para la comparación en algunos experimentos, se utilizó la cepa comercial “La Azteca S.A.” de *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas se conservaron en placas de YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) solidificado con 2% de agar.

Para cada una de las cepas se sembró una asada de la levadura en 400 mL de medio YPD líquido y se incubó bajo agitación constante (250 rpm) a 28-30 °C; para *D. hansenii* la incubación fue de 42 h. En el caso de *S. cerevisiae* se incubó durante 24 h y se centrifugó aproximadamente a 2000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se eliminó el medio y se lavaron las células con 250 mL agua destilada, obtenidas las células se resuspendieron en 250 mL de agua y se ayunaron por 18 h.

Ambas cepas se colectaron por centrifugación aproximadamente a 2000 rpm y se lavaron con agua destilada, las células obtenidas se empaquetaron mediante centrifugación aproximadamente a 3000 rpm durante 5 minutos y se obtuvo la masa húmeda de cada una.

7.2 Extractos libres de células.

Las células después de ser cosechadas, se resuspendieron al 50% (masa húmeda/volumen) en un amortiguador de ruptura frío (MOPS 10 mM pH 7.0 ajustado con HCl, al cual se le agregó previamente una pastilla de un inhibidor de proteasas “Complete” de Roche por cada 50 mL de amortiguador).

Se usó una cámara del “Bead Beater” proporcional al volumen de la suspensión obtenida y se le agregaron perlas de vidrio frías de 0.45 mm de diámetro al 50% de su capacidad, después se le añadió la suspensión de levaduras. Ya preparada la cámara se le colocaron dos camisas con hielo y se rompieron las células a través de 4 pulsos de 20 segundos con intervalos de 1 minuto en un cuarto con una temperatura de 6 a 8 °C.

Se decantó la suspensión de células en tubos para el rotor JA25.50 (previamente frío), y se centrifugó en una centrifuga BECKMAN a una velocidad de 756 X g (2500 rpm)



durante 10 minutos. El sobrenadante se distribuyó en tubos de microfuga y se conservó en un ultracongelador REVCO a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.3 Determinación de proteína por el método de Lowry.

La cuantificación de proteína se realizó a partir de la metodología propuesta por Markwell *et al.* (1978). Se preparó la “Mezcla C” con las soluciones A y B (Tabla 1) en una proporción 100:1.

Tabla 1. Concentraciones de las soluciones A y B

Solución A	Concentración %	Solución B	Concentración %
Na_2CO_3	2.0	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4
NaOH	0.4		
Na_2K tartrato	0.16		
SDS	1.0		

Se usó una alícuota de los extractos libres de células y se preparó una curva patrón utilizando albumina bovina sérica (BSA) como estándar, siguiendo la metodología indicada en la tabla 2.

Tabla 2. Determinación de la cantidad de proteína en extractos libres de células.

Curva patrón Proteína: (μg)	H_2O (mL)	BSA 1mg/mL	Mezcla C (mL) Incubar 10 min a temperatura ambiente	Folin 1 N (mL) Incubar 30 min
0	1.0	0.000	3.0	0.3
25	0.975	0.025	3.0	0.3
50	0.950	0.050	3.0	0.3
100	0.900	0.100	3.0	0.3
150	0.850	0.150	3.0	0.3
200	0.800	0.200	3.0	0.3
Muestra (μL)				
5	0.995	-----	3.0	0.3
5	0.995	-----	3.0	0.3
10	0.990	-----	3.0	0.3
10	0.990	-----	3.0	0.3



Previamente al tratamiento, se realizaron diluciones en cada muestra para que fuera posible interpolar la concentración dentro de la curva patrón. Después de la incubación de 30 minutos, cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a una $\lambda = 660 \text{ nm}$ en celdas de vidrio.

A partir de la ecuación general de una recta $Y = mx + b$ (Fig. 5), se realizó el cálculo para determinar la dilución del extracto crudo necesaria para obtener:

- 1 mg de proteína para la reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato.
- 0.125 mg de proteína para la reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato.

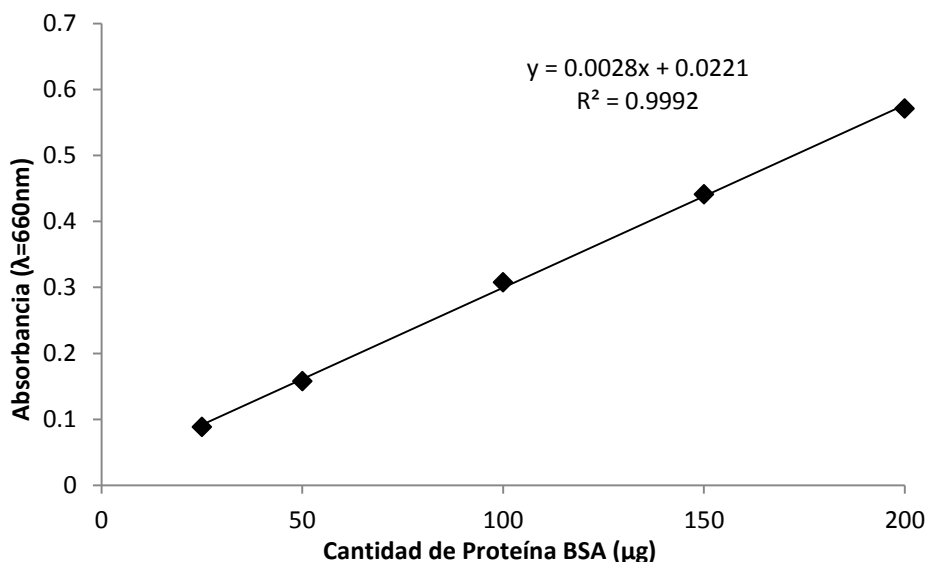


Figura 5. Ejemplo de una curva patrón de BSA para la cuantificación de proteína por el método de Lowry.

7.4 Ensayos de actividad enzimática de la GDH-NAD⁺.

7.4.1 Generalidades.

Como se muestra en la figura 6 ó 7, cada determinación se realizó a través de dos ensayos totalmente independientes: Uno en ausencia, y otro agregando el sustrato desde el inicio de la reacción junto con los reactivos restantes (Tabla 3 ó 6), con excepción del extracto crudo.



Tabla 3. Reactivos utilizados para la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺.

Reactivos stock	Volumen (μ L)	Concentración en el ensayo (mM)
MOPS-HCl 0.1 M pH 7	200	10
β -NADH, sal dipotásica 13 mM	20	0.13
NH ₄ Cl 1 M	5	2.5
α -cetoglutarato monosódico 0.5 M	40	10
H ₂ O (desionizada)	C.b.p 2000	-----
Extracto crudo	para 1 mg total	-----

La actividad enzimática específica se determinó indirectamente a través de la oxidación del NADH o reducción del NAD⁺ a una λ de 340 nm. En cada ensayo se colocó la celda con la mezcla de reacción en un espectrofotómetro, se dejó equilibrar a 30°C por 100 segundos y se agregó inmediatamente por medio de una microjeringa el volumen necesario para 1 mg o 0.125 mg de proteína del extracto libre de células según fuera la reacción.

Para el cálculo de la actividad enzimática específica, se tomó cada pendiente obtenida de los primeros 60 segundos de la reacción (Fig. 6 y 7). Se le restó a la pendiente con sustrato la pendiente basal (Δ Abs) y se aplicó (1).

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{Abs} (\text{min}^{-1}) * \text{Vol. reacción (L)} * 10^9}{\epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) * b (\text{cm}) * 1 \text{mg}} = \text{nmol/min/mg} \quad (1)$$

Donde:

Δ Abs: es la diferencia de pendientes obtenidas de la figura 6 ó 7, del primer minuto de la reacción.

ϵ : es el coeficiente de extinción molecular para el NADH, $6.317 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b: es la distancia de la celda, que corresponde a 1 cm.

Vol. reacción: es el volumen total de la reacción enzimática.



7.4.1.1 Reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato.

7.4.1.1.1 Variación de las concentraciones de NADH.

Se realizó el procedimiento indicado en (7.4.1 Generalidades) utilizando solamente extractos libres de células de *D. hansenii* para la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato, con concentraciones crecientes de NADH (0.05; 0.13; 0.3; 0.7 mM), usando un concentración de 250 mM de Na^+ o K^+ de cada sal.

7.4.1.1.2 Efecto de las sales de fosfato.

Se llevaron a cabo cinco determinaciones para las GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*: una en ausencia de sal y cuatro más agregando concentraciones crecientes de las sales de fosfato (Tabla 4).

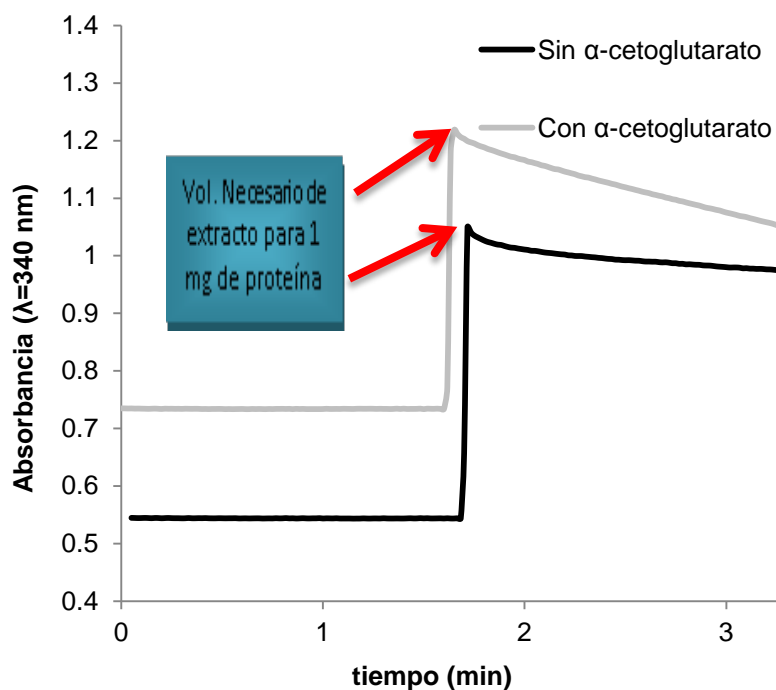


Figura 6. Ejemplo de dos ensayos espectrofotométricos independientes, a partir de la oxidación de NADH. A cada celda se le agregó el volumen de extracto crudo necesario para tener 1 mg de proteína. Ensayo con sustrato (línea clara), ensayo sin sustrato (línea oscura).



Tabla 4. Soluciones de fosfatos para ambas reacciones enzimáticas de la GDH-NAD⁺.

Reactivos stock	Volumen (μL)	Concentración en el ensayo (mM)
KH ₂ PO ₄ -KOH 2 M pH 7	50; 100; 250; 500	K ⁺ 50; 100; 250; 500
NaH ₂ PO ₄ -NaOH 2 M pH 7	50; 100; 250; 500	Na ⁺ 50; 100; 250; 500

Se utilizó la sal ácida de cada catión 2 M y se llevó a pH 7 con su correspondiente solución básica 2 M.

7.4.1.1.3 Efecto de las sales de cloruro.

Las determinaciones se realizaron como en (7.4.1.1), cambiando las sales de fosfato por sales de cloruro (Tabla 5).

Tabla 5. Soluciones de cloruros para ambas reacciones enzimáticas de la GDH-NAD⁺.

Reactivos stock	Volumen (μL)	Concentración en el ensayo (mM)
KCl 2 M	50; 100; 250; 500	K ⁺ 50; 100; 250; 500
NaCl 2 M	50; 100; 250; 500	Na ⁺ 50; 100; 250; 500

7.4.1.2 Reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato.

7.4.1.2.1 Efecto de las sales de fosfato.

Este sentido de la reacción se cuantificó a partir de la metodología propuesta por Bonete, *et al.*, (2003). Se hizo una modificación en la concentración de NAD⁺ de 1.5 mM y 0.125 mg de proteína en el extracto (Fig. 7). Se llevaron a cabo cinco determinaciones para las GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*: una en ausencia de sal y cuatro más agregando concentraciones crecientes de las sales de fosfato (Tabla 4 y 6).



Tabla 6. Reactivos utilizados para la reacción de desaminación oxidativa de L-glutamato de la GDH-NAD⁺.

Reactivos stock	Volumen (μL)	Concentración en el ensayo (mM)
MOPS-HCl 0.1 M pH 7	200	10
β-NAD ⁺ 60 mM	50	1.5
L-Glutamato 1 M	100	50
H ₂ O (desionizada)	C.b.p 2000	-----
Extracto crudo	para 0.125 mg total	-----

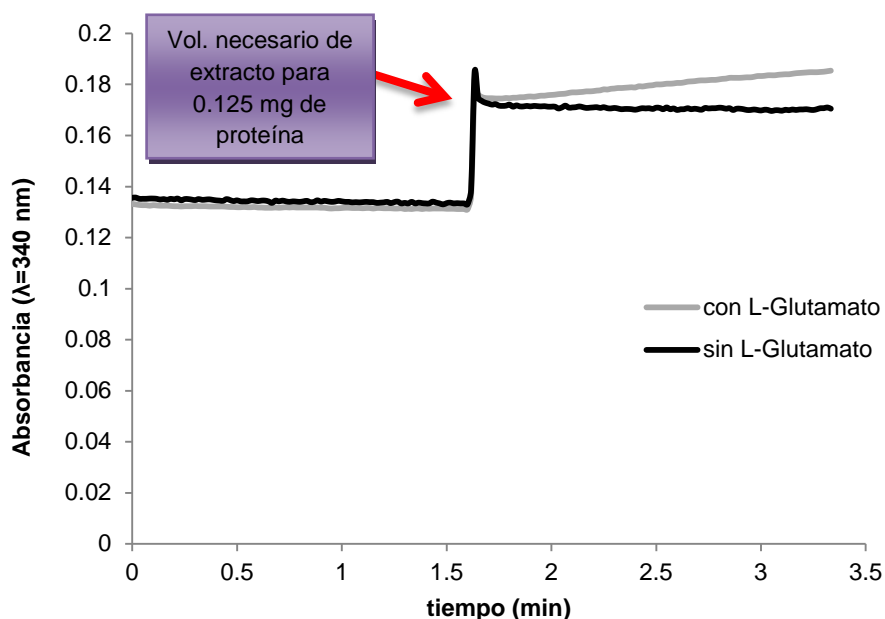


Figura 7. Ejemplo de dos ensayos espectrofotométricos independientes, de la formación de NADH (reducción de NAD⁺). A cada celda se le agregó el volumen de extracto crudo necesario para tener 0.125 mg de proteína. Ensayo con L-glutamato (línea clara), ensayo sin L-glutamato (línea oscura).

7.4.1.3 Efecto del ADP en ambos sentidos de la reacción de la GDH-NAD⁺.

Se llevaron a cabo las determinaciones en los dos sentidos de la reacción; utilizando los reactivos como en la tabla 3 y en la tabla 6 para cada reacción, en presencia de 0.3 mM ADP, y con 250 mM de las sales de K⁺ y Na⁺ en sus formas de fosfatos y cloruros. Se



utilizó una concentración de 0.5 mM de NAD^+ para la reacción de desaminación oxidativa del glutamato.

7.4.1.4 Determinación de la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH- NAD^+ .

La determinación se realizó a partir de dos ensayos; en el primero se agregaron los reactivos mostrados en la tabla 3, con excepción del NH_4Cl ; se agregó solamente piruvato 10 mM como sustrato para restar la actividad de las deshidrogenasas inespecíficas y se utilizó 0.125 mg de proteína. El segundo ensayo se realizó como el anterior, pero agregando 2.5 mM de NH_4Cl . La actividad se midió en el sentido de aminación reductiva en presencia de 250 mM de Na^+ o K^+ de las distintas sales utilizadas. La concentración usada de piruvato, se tomó partir de la metodología propuesta por Tomkins *et al.* (1965).



8. RESULTADOS

Se estudió la actividad de la GDH-NAD⁺ en extractos libres de células a través de ensayos a un pH de 7 y a una temperatura constante de 30 °C, en presencia de distintas sales de sodio o potasio.

8.1 Reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato.

8.1.1 Efecto de la concentración de NADH sobre la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*.

En la figura 8 se muestra la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* a concentraciones crecientes de NADH, en la aminación reductiva del α -cetoglutarato. Se puede observar que la actividad de la GDH-NAD⁺ cambia según la concentración de esta coenzima, de manera que a bajas concentraciones de NADH la actividad aumenta; pero al seguir aumentando la concentración de NADH, después de un máximo de actividad, a una concentración de 0.13 mM de NADH, la actividad va disminuyendo. Este efecto en donde se observa un tipo de campana, concuerda con lo reportado por Yielding *et al.* (1964), quienes encontraron que la disminución de la actividad de la GDH-NAD⁺ de hígado de bovino se debe a la disgregación de la enzima.

Al analizar la actividad de la enzima en presencia de las distintas sales de sodio o potasio, se observó que la actividad también dependió de la concentración de NADH, y que también la concentración ideal es de 0.13 mM. Con esta concentración de NADH se realizaron los experimentos posteriores, ya que se pueden notar las variaciones de la actividad enzimática en presencia de las sales. Otro punto importante es la inhibición de la enzima casi en su totalidad a una concentración de 0.7 mM de NADH, tanto en ausencia como en presencia de sal, y que la capacidad de inhibición de cada sal no se modifica al variar la concentración de la coenzima.

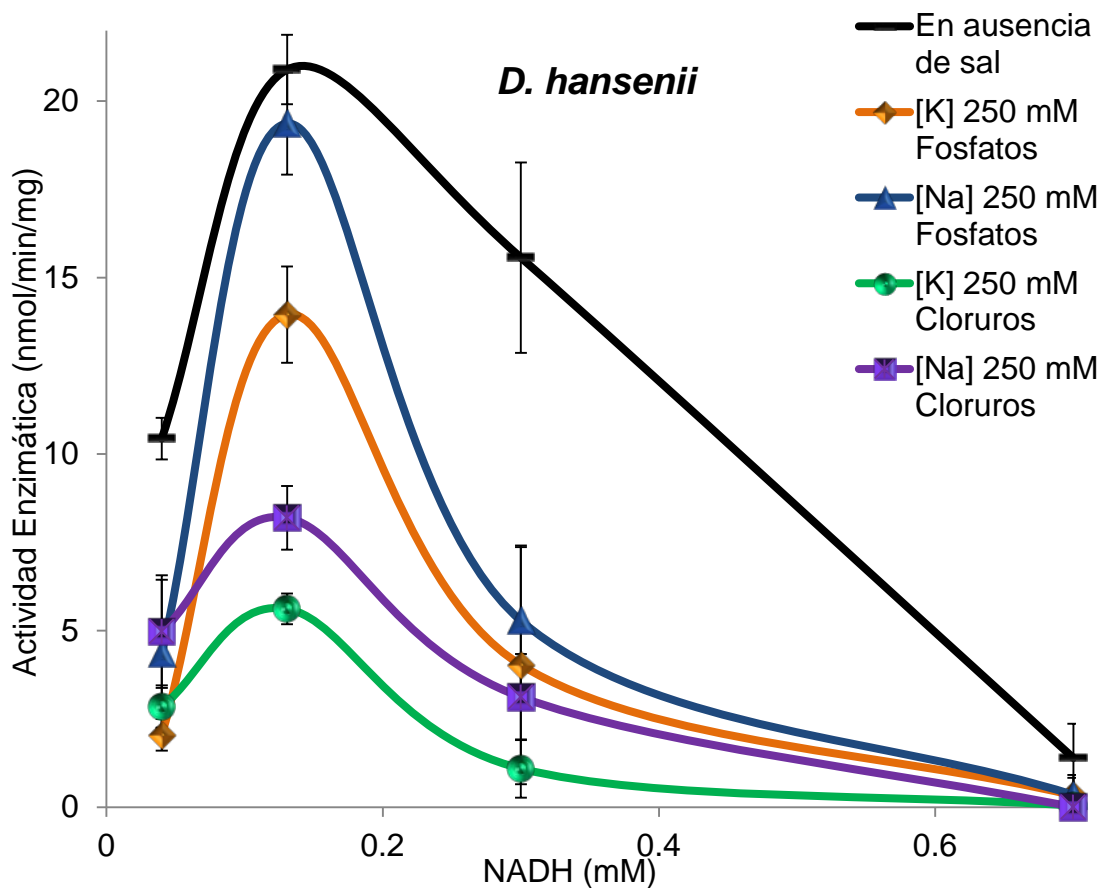


Figura 8. Curva de NADH en la actividad enzimática de la reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *D. hansenii* Y7426, usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 . Promedios \pm D.S de $n = 6$.

8.1.2 Inhibición de la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* por fosfato de sodio y fosfato de potasio.

Las siguientes determinaciones se realizaron usando una concentración de 0.13 mM de NADH.

En experimentos anteriores del laboratorio se encontró que al crecer a *D. hansenii* en YPD con 1.0 M de sal, la concentración del fosfato inorgánico (Pi) aumenta, pasando de 40.6 mM en YPD sin sal, a 51.3 mM en YPD con 1.0 M de KCl y a 65 mM en YPD con 1.0 M de NaCl (Sánchez *et al.*, 2008). Debido a esto se decidió medir la actividad enzimática de *D. hansenii* en presencia de concentraciones crecientes de Na⁺ o K⁺ utilizando la respectiva sal de fosfato, desde 50 a 500 mM de cada catión (Fig. 9).

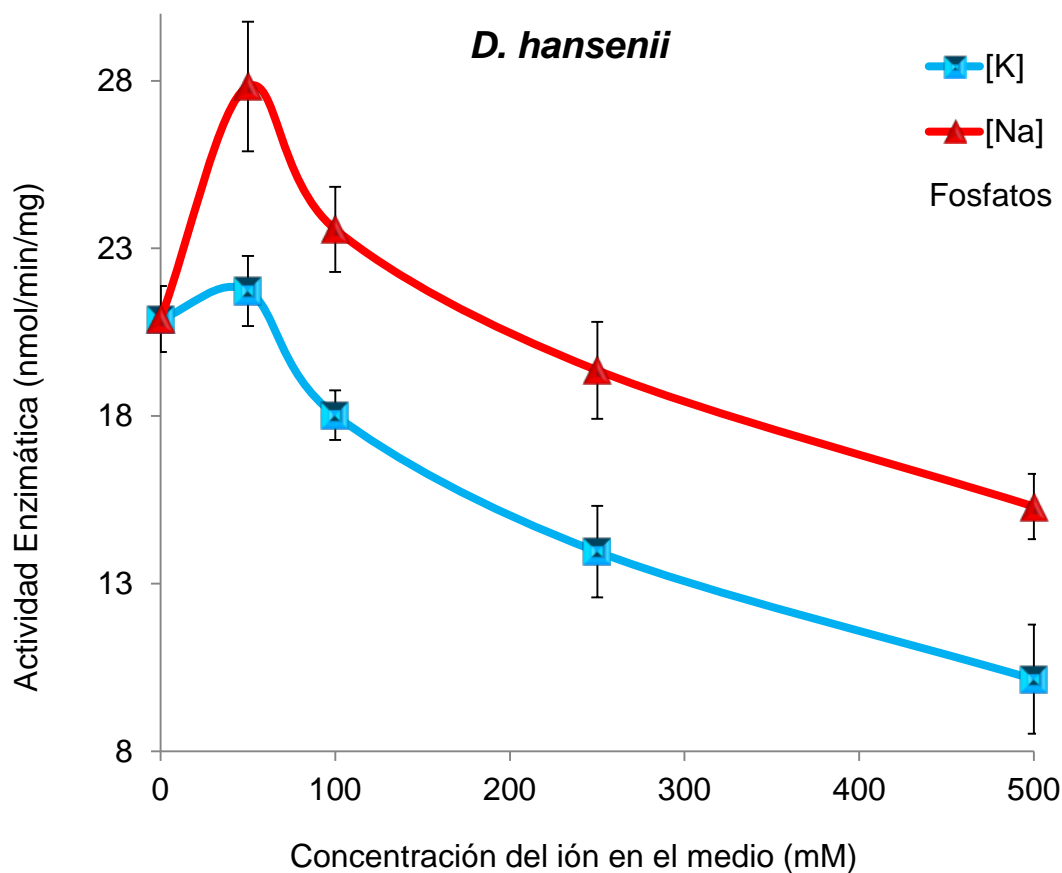


Figura 9. Inhibición por sales de fosfato de la reacción enzimática de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *D. hansenii* Y7426, usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 . Promedios \pm D.S de $n = 9$.

La figura 9 muestra la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de concentraciones crecientes de Na⁺ y K⁺ a partir de sus sales de fosfato, en la aminación reductiva del α -cetoglutarato. Se observa que la actividad de la enzima se estimuló a bajas concentraciones del ión (50 mM de Na⁺ o K⁺, y 100 mM de Na⁺); sin embargo, al aumentar la concentración se observó una disminución paulatina de la actividad enzimática con respecto a la actividad en ausencia de sal. Por otra parte, es claro que la actividad de esta enzima fue mayor en presencia de Na⁺ con respecto a la actividad con K⁺, teniendo diferencias de hasta 5 unidades. La actividad de la GDH-NAD⁺ en presencia de elevadas concentraciones de sal disminuyó; sin embargo, no se llegó a una inhibición total, ya que la enzima aún era activa en presencia de 500 mM de K⁺.



Dado que *S. cerevisiae* se considera como un organismo modelo y se clasifica como un halosensible, se comparó el comportamiento de la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* con el de la GDH-NAD⁺ de *S. cerevisiae* en presencia o ausencia de sales de fosfato (Fig. 10). Se encontró primero que las actividades de las enzimas de ambas levaduras son muy similares en ausencia de sal, observándose una actividad de 20 a 22 nmol/min/mg; sin embargo, la estimulación por la sal a bajas concentraciones en la enzima de *S. cerevisiae* fue mayor que en la enzima de *D. hansenii*, lográndose actividades de hasta 36 nmol/min/mg en presencia de 50 mM Na⁺ en *S. cerevisiae*.

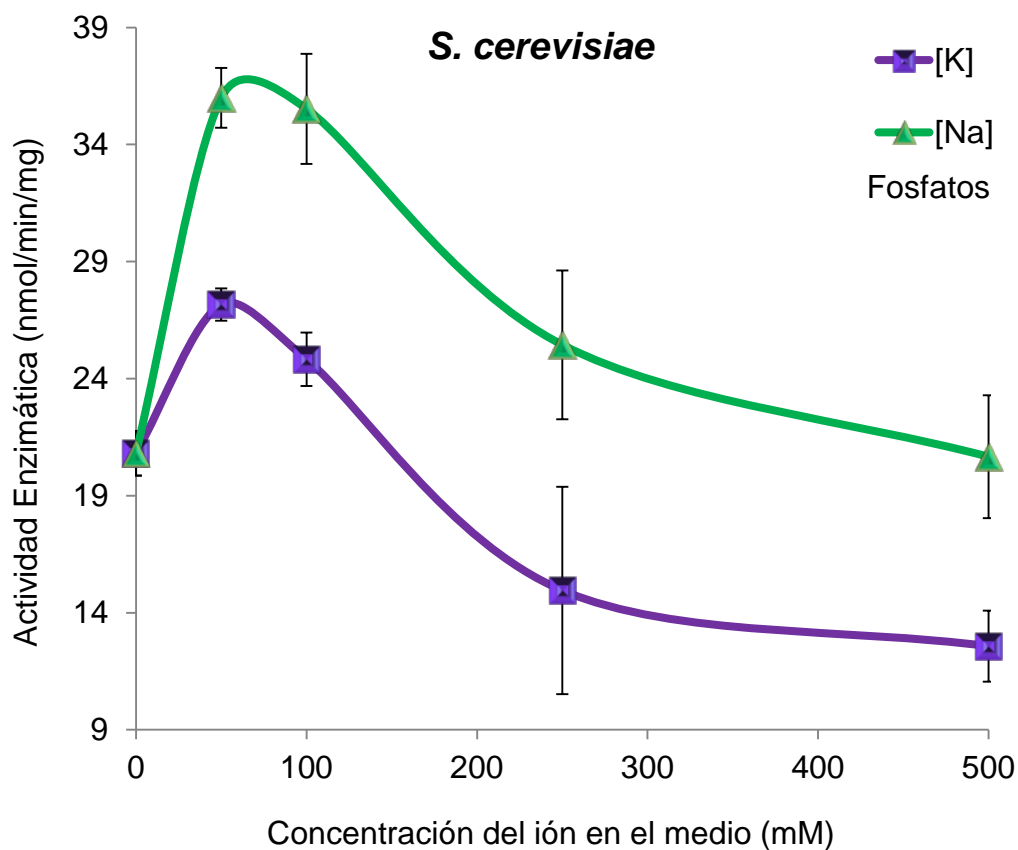


Figura 10. Inhibición por sales de fosfato de la reacción enzimática de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *S. cerevisiae* cepa “La Azteca, S.A”, usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 . Promedios \pm D.S de $n = 9$.

De manera general, el comportamiento de ambas enzimas es muy similar, ya que ambas son más resistentes a la fuerza iónica del Na⁺ que con K⁺, sin embargo a pesar



de que *S. cerevisiae* no es un microorganismo halotolerante, mostró una mayor resistencia a la sal en este sentido de la reacción, que la enzima de *D. hansenii*.

8.1.3 Inhibición de la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* por cloruro de sodio y cloruro de potasio.

Se sabe que el Cl⁻, no es capaz de internalizarse en *S. cerevisiae* ni en *D. hansenii* (Coury *et al.*, 1999; Sánchez, 2008). Es por esto que se decidió averiguar qué sucedería al poner a la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de sales de cloruro (Fig.11).

En la figura 11 se observa la diferencia del efecto de las sales de cloruro y las de fosfato en la reacción enzimática de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *D. hansenii*. Una de las principales diferencias que se observó en la actividad de la GDH-NAD⁺ en presencia de estas cuatro sales, es que las sales de cloruro inhibieron mucho más la actividad de la enzima que las sales de fosfato, ya que desde bajas concentraciones de Na⁺ o K⁺ (50 mM) de la sal de cloruro, disminuyó la actividad hasta en un 50 % con respecto a la actividad en ausencia de sal; además, después de una concentración de 100 mM de cualquier sal, la actividad disminuyó drásticamente hasta 6 nmol/min/mg, manteniéndose relativamente constante hasta una concentración 500 mM. Por último es claro que el KCl produjo una mayor inhibición que el NaCl.

También se realizaron las determinaciones de la GDH-NAD⁺ de *S. cerevisiae* en igualdad de circunstancias, de manera comparativa con *D. hansenii* (Fig. 12).

La GDH-NAD⁺ de *S. cerevisiae* también fue más resistente a las sales de cloruro en este sentido de la reacción al compararla con la actividad de la GDH-NAD⁺ *D. hansenii*. En la figura 12 se observa que la actividad en *S. cerevisiae* fue igual o mayor que la actividad en ausencia de sal, hasta una concentración de 100 mM de las sales de cloruro. Caso contrario a la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* (Fig. 11), la cual mostró una disminución drástica de la actividad a esa concentración de las sales.

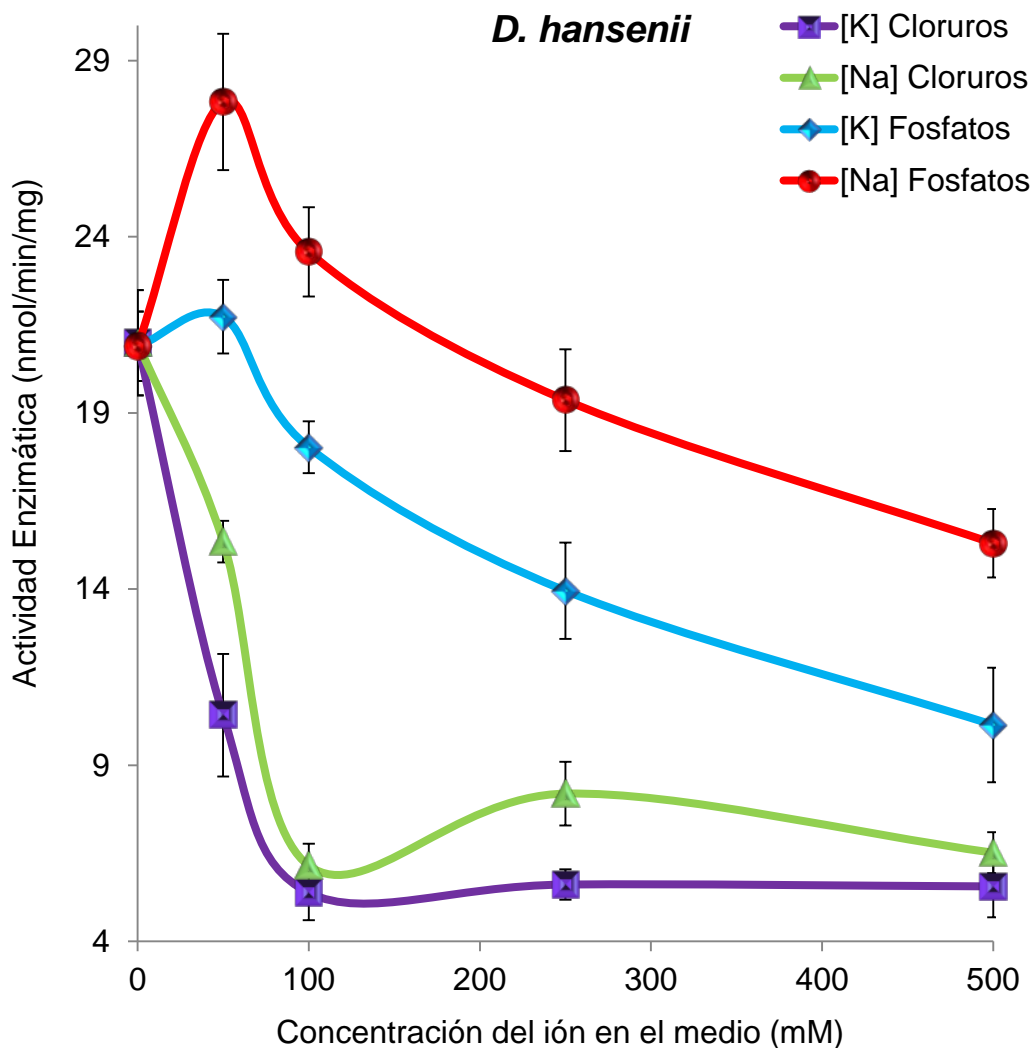


Figura 11. Efecto de las sales de cloruro sobre las de fosfato de la reacción enzimática de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *D. hansenii* Y7426, usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 pH 7 y soluciones de KCl y NaCl, como se menciona en la metodología. Promedios \pm D.S de $n > 6$.

Es importante mencionar que no se observan diferencias estadísticamente significativas, al comparar las actividades de *S. cerevisiae* en presencia de cualquier concentración de NaCl con las actividades en presencia de KCl (Fig. 12).

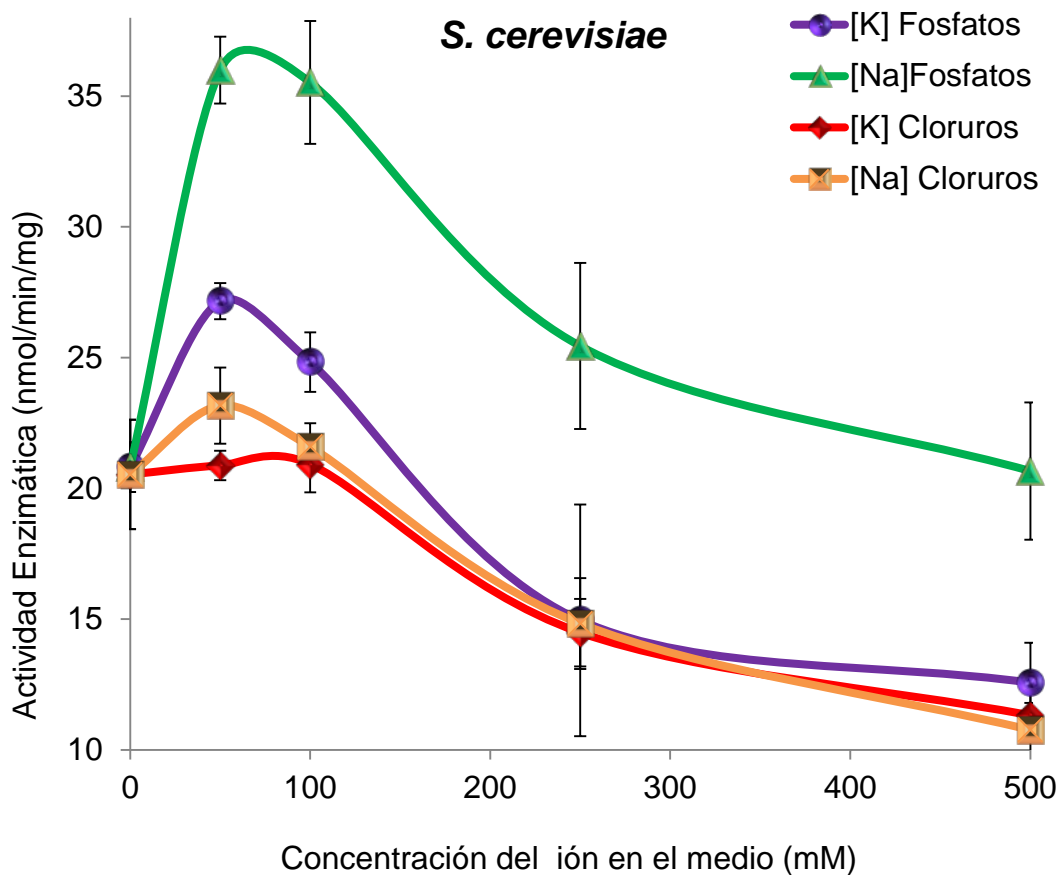


Figura 12. Efecto de las sales de cloruro y de fosfato de la reacción enzimática de aminación reductiva del α -cetoglutarato de *S. cerevisiae* cepa "La Azteca, S.A", usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 pH 7 y soluciones de KCl y NaCl. Promedios \pm D.S de $n > 6$.

8.2 Reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato.

Al comparar las actividades de la GDH- NAD^+ de *D. hansenii* con las actividades de *S. cerevisiae*, se demostró que las enzimas de ambos géneros de levadura muestran un comportamiento similar en presencia de sal; inclusive la GDH- NAD^+ de *S. cerevisiae* se estimuló más con las sales utilizadas en este trabajo, en especial fosfato, que la GDH- NAD^+ de *D. hansenii*.

Es por esto que se decidió realizar la determinación de la actividad de la GDH- NAD^+ en ambas levaduras, pero ahora en el sentido de desaminación oxidativa del L-glutamato, en ausencia y presencia de sal.



8.2.1 Inhibición de la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* por fosfato de sodio y fosfato de potasio.

La figura 13 muestra la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de sales de fosfato, a través de la reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato, utilizando una concentración de 1.5 mM de NAD⁺.

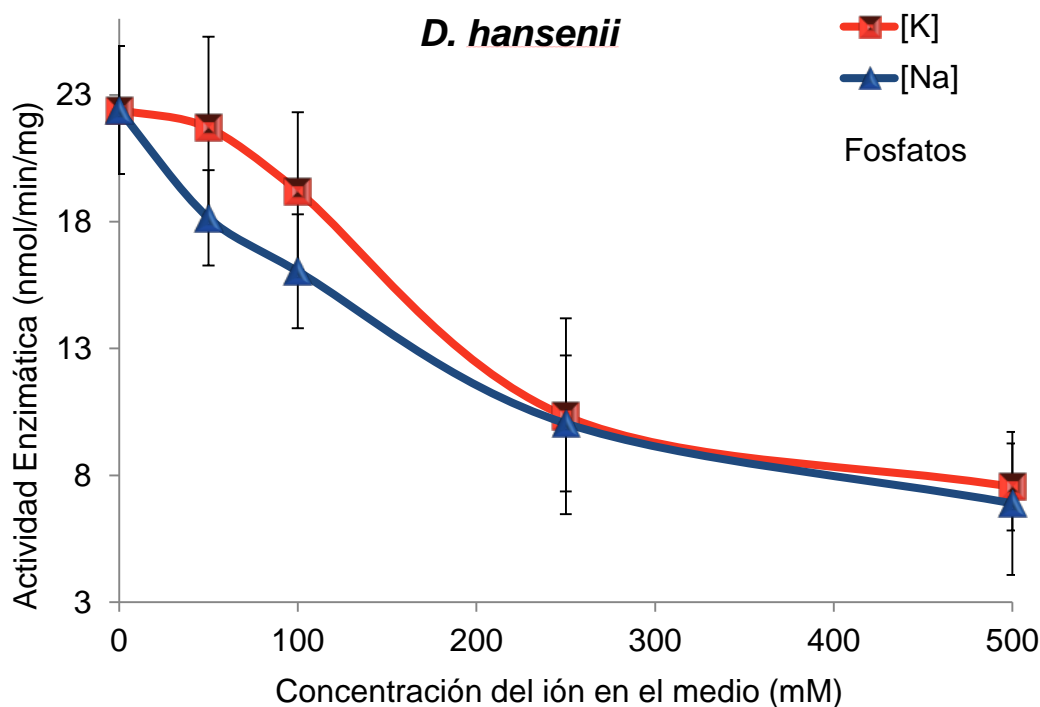


Figura 13. Inhibición por sales de fosfato de la reacción enzimática de la desaminación oxidativa de L-glutamato de *D. hansenii* Y7426, usando soluciones de KH₂PO₄ y NaH₂PO₄, pH 7 como se menciona en la metodología. Promedios ± D.S de n = 9.

Algunas enzimas solamente pueden ser activas en un sólo sentido de la reacción; éste no es el caso de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*; que es capaz de asimilar amonio, para que de esta forma esté disponible en forma de glutamato para la formación de distintos aminoácidos y ácidos nucleicos, o producir un intermediario metabólico del ciclo de Krebs como el α -cetoglutarato, para la producción de energía (ATP). Es importante mencionar que las actividades en ambos sentidos de la reacción en ausencia de sal son muy similares.



Una de las principales variaciones que encontramos en este sentido de la reacción, es que a diferencia de sentido de aminación reductiva de α -cetoglutarato (Fig. 9), en donde la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* es más sensible a la fuerza iónica producida por cualquier concentración de Na⁺ en comparación con el K⁺, no hay un efecto significativamente diferente entre los dos cationes, usando una concentración de 1.5 mM de NAD⁺. Además en este sentido de la reacción no se observa una estimulación temprana de la actividad en presencia de sal; sin embargo, se observó actividad aún en presencia de altas concentraciones de Na⁺ o K⁺ (500 mM).

Por otra parte, a pesar que la GDH-NAD⁺ de *S. cerevisiae* también puede catalizar la reacción en ambos sentidos, se observó que la actividad en ausencia de sal (14.5 nmol/min/mg) es menor, en comparación con la reacción de desaminación oxidativa de L-glutamato en *D. hansenii* (22.8 nmol/min/mg). Además, la actividad de la GDH-NAD⁺ de *S. cerevisiae* en presencia de Na⁺, disminuyó drásticamente después de una concentración de 50 mM de Na⁺ (Fig. 14), al compararla con la actividad de *D. hansenii* (Fig. 13). En este sentido de la reacción, en *S. cerevisiae*, sólo se observó una ligera estimulación a bajas concentraciones de K⁺, en comparación con la reacción de aminación reductiva del α -cetoglutarato. Además, a una concentración de 500 mM de K⁺ esta enzima es muy resistente a esta sal de fosfato, por lo que aun a elevadas concentraciones de Na⁺ o K⁺, no se inhibe completamente.

8.3 Efecto del ADP en ambos sentidos de la reacción de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*.

Se ha reportado que el ADP funciona como un activador de la GDH (Frieden, 1965; Koberstein y Sund, 1973). y que actúa como protector en presencia de algunos esteroides (Yielding *et al.*, 1960).

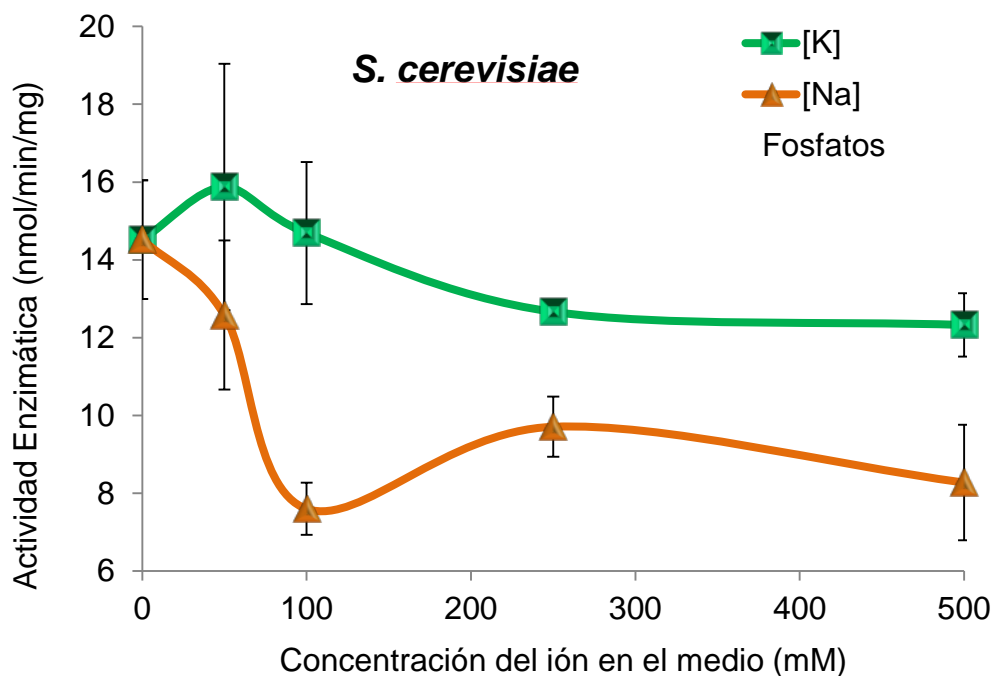


Figura 14. Inhibición por sales de fosfato de la reacción enzimática de la desaminación oxidativa del L-glutamato de *S. cerevisiae* cepa "La Azteca, S.A", usando soluciones de KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 pH 7. Promedios \pm D.S de $n = 9$.

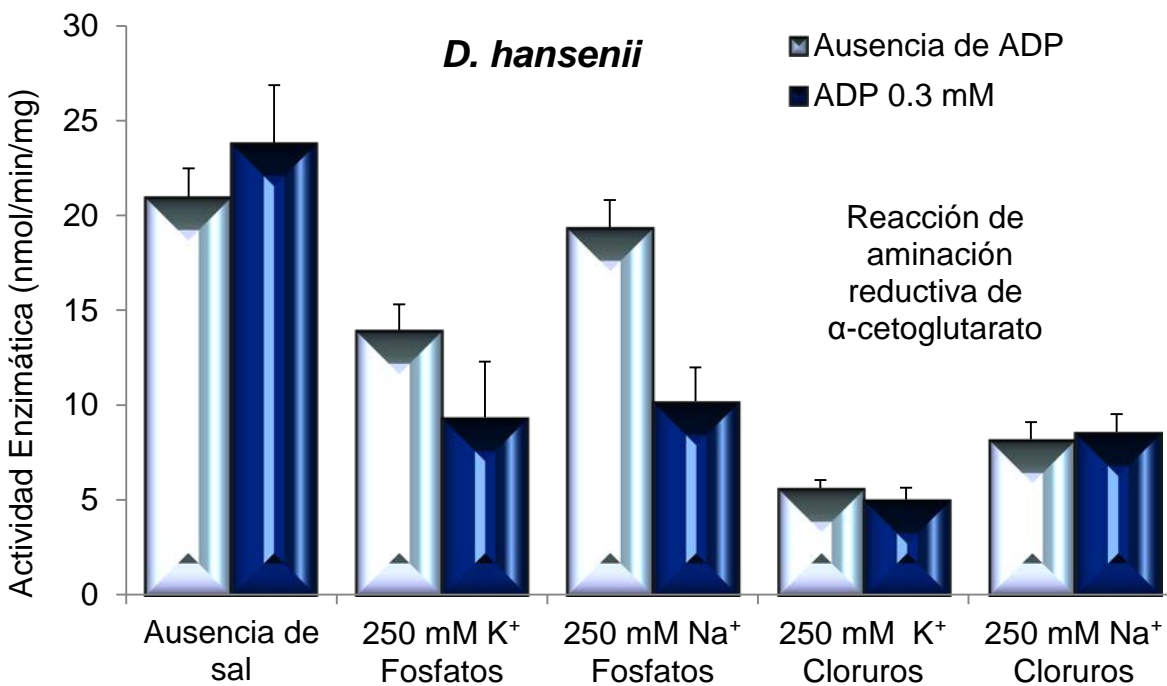


Figura 15. Efecto del ADP en la reacción enzimática de la aminación reductiva del α -cetoglutarato de *D. hansenii* Y7426 (barras verdes en ausencia de ADP en el ensayo, barras azules 0.3 mM de ADP). Promedios \pm D.S de $n > 6$.



La intención de exponer a la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* a la presencia de sal, agregando ADP a la reacción, fue debido a que se pensaba que el efecto de inhibición por sal se produce por un mecanismo similar al de algunos esteroides al inhibir la enzima, disgregando a la enzima en subunidades, y que este efecto podría contrarrestarse con la adición de ADP; sin embargo, no fue así.

Se analizó el efecto del ADP sobre la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de sales de fosfato y de cloruro, a través de la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato (Fig. 15). Se observó una activación de la GDH-NAD⁺ por el ADP en ausencia de sal, pero al medir las actividades de esta enzima sólo en presencia de sales de fosfato y en presencia de ADP, se notó un efecto inhibitorio mayor al producido por las sales de fosfato en ausencia de ADP. Debe notarse que en el caso de las actividades en presencia de las sales de cloruro, la actividad no se vio modificada por la adición de ADP a la reacción.

Por otra parte, también se comprobó el efecto del ADP en el sentido contrario de la reacción (Fig. 16). Se volvió a observar el efecto de inhibición por el ADP en presencia de sales de fosfato, sin variación de la inhibición en presencia de sales de cloruro al agregar ADP. Sin embargo, en este sentido de la reacción el ADP parece jugar un papel inhibitorio en condiciones basales (en ausencia de sal), contrario a la activación observada en la figura 15.

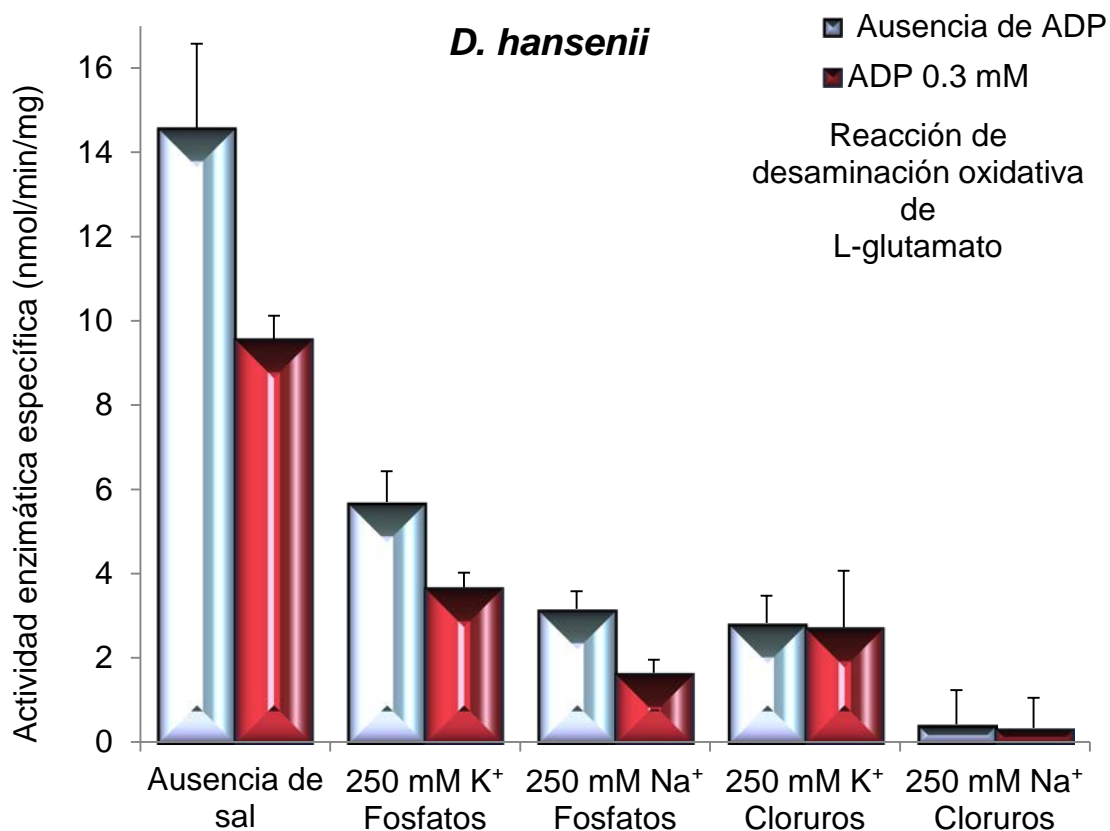


Figura 16. Efecto del ADP en la reacción enzimática de la desaminación oxidativa de L-glutamato de *D. hansenii* Y7426. Promedios \pm D.S de n = 6.

8.4 Actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*.

Como ya se ha mencionado, pensamos que el efecto inhibitorio por la sal, se debe a la disgregación de la GDH-NAD⁺ en subunidades y que cada subunidad cataliza la reacción de L-AlaDH, al estar en contacto con esteroides como lo propusieron Tomkins. *et al.* (1965) y se sabe que *D. hansenii* no cuenta en su genoma con el gen que expresa a la L-AlaDH. Por esto se realizaron ensayos para medir la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*, en presencia de sal (Fig. 17).

Las determinaciones se realizaron a través de la reacción de aminación reductiva del piruvato.

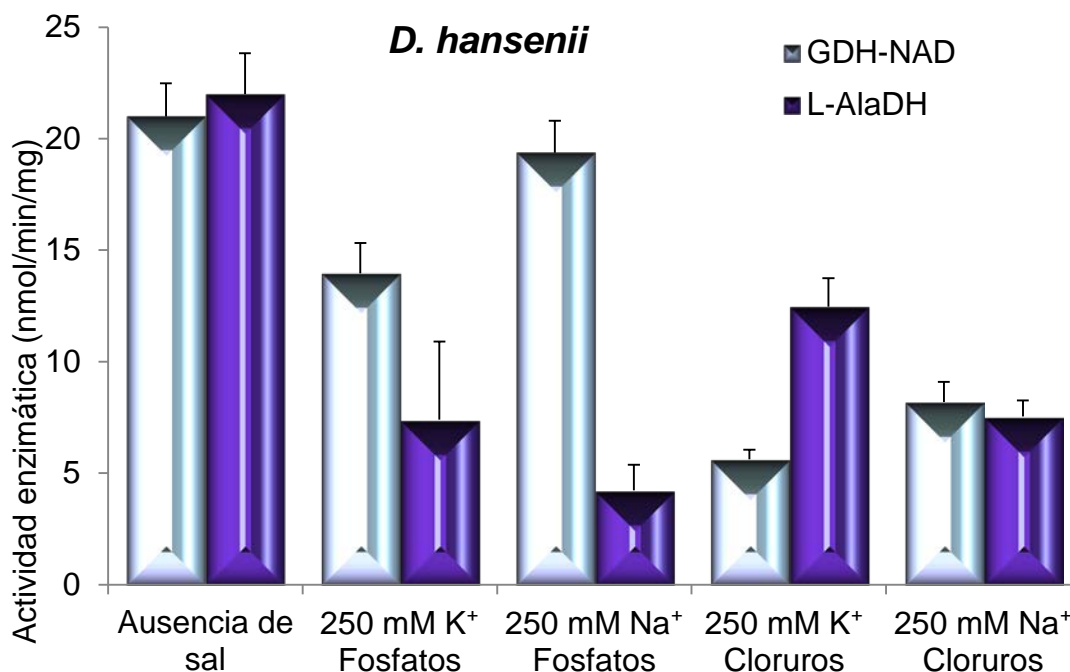


Figura 17. Comparación de la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺, con la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* Y7426, a través de la aminación reductiva de piruvato. Promedios \pm D.S de $n > 6$.

En Figura 17 se muestra la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de sales de cloruro y de fosfato. Se observó que la GDH-NAD⁺ tuvo actividad de L-AlaDH, asimilando el amonio y el piruvato en ausencia de sal, pero esta actividad decreció en presencia de sal. Sin embargo, a diferencia de la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺, se encontró una mayor inhibición de la actividad de alanina deshidrogenasa por las sales de Na⁺; por otra parte, es claro que las sales de fosfato inhiben más esta actividad que las sales de cloruro, contrario a lo que sucede con la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato de la GDH-NAD⁺. Por último, es importante mencionar que nunca se observó una inhibición total en ninguna reacción, ni en la reducción del α -cetoglutarato o del piruvato, y que al sumar las actividades individuales de cada reacción en presencia de cualquier sal, se obtiene una actividad muy similar a la obtenida en ausencia de sal (21 a 22 nmol/min/mg).



Por otra parte, se cuantificó la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en presencia de sal, a través de la reacción de desaminación oxidativa de L-alanina; sin embargo, no se observaron indicios de que la enzima catalice la reacción en este sentido (experimentos no mostrados).



9. DISCUSIÓN

9.1 Cooperatividad negativa.

La GDH-NAD⁺ se comporta de dos maneras distintas; a bajas concentraciones de NADH la actividad aumenta, pero al aumentar la concentración de esta coenzima, la actividad disminuye. Creemos que la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* tiene dos sitios de unión para el NADH; uno cercano al sitio activo, el cual estimula la actividad y otro en un sitio como inhibidor alostérico, similares a los sitios de la GDH de bovino (Fig. 18).

Este último sitio de unión para el NADH se ha sugerido para inhibir a la enzima, uniéndose en forma sinérgica con el GTP (Frieden, 1958, 1959). Se ha demostrado que el NAD(P)H que se une a la subunidad inicial debilita la afinidad de la subunidad posterior (Melzi-D'eril y Dalziel, 1973), a esto se le ha denominado cooperatividad negativa. En general, se cree que ayuda a la enzima mantener una velocidad catalítica uniforme, ya que las concentraciones de coenzima o del sustrato varían *in vivo* (Koshland, 1996). También es posible que la cooperatividad negativa sea una consecuencia de la comunicación entre la subunidad que se utiliza para otros fines en lugar de la regulación.

9.2 La inhibición por las sales parece ser un efecto meramente químico.

Se observó que las sales de potasio producen una mayor inhibición que las sales de sodio en la GDH-NAD⁺, esta variación se puede deber meramente a un efecto químico y no necesariamente a un efecto fisiológico, ya que se sabe que el sodio es un metal cuyo número atómico es 11, es decir posee 11 protones en su núcleo, por otra parte el potasio posee 19 protones, 8 más que el sodio, debido a esto, el tamaño y densidad electrónica del potasio son mayores que los del sodio; de esta forma, el enlace que se genera con el anión en una sal, es más fuerte con sodio que con el potasio, ya que la densidad electrónica en el átomo de potasio hace que el último electrón de la capa de valencia no esté tan atraído por el núcleo y de esta manera se libere con mayor facilidad

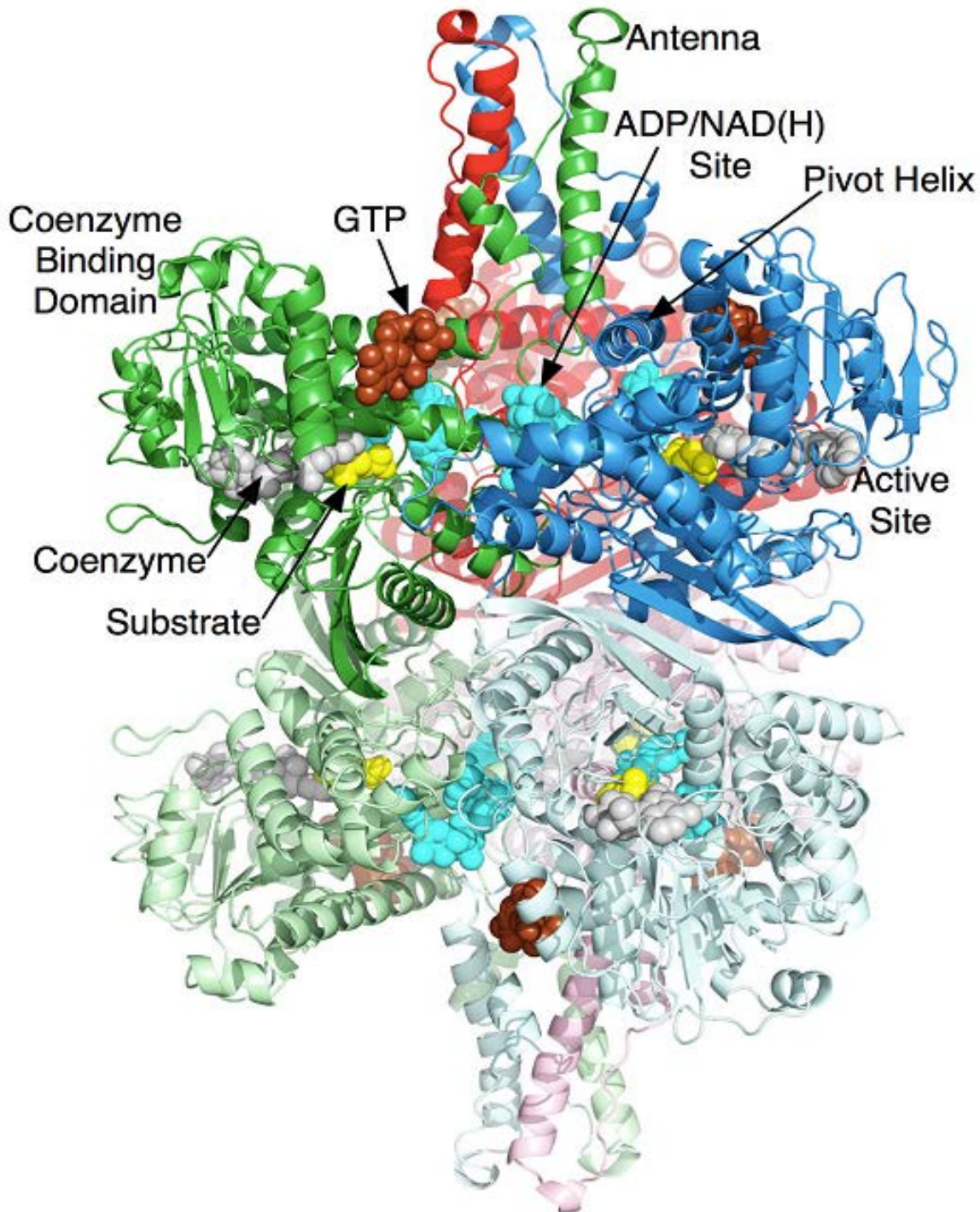


Figura 18. Estructura cuaternaria de la glutamato deshidrogenasa de mamífero. Diagrama de cintas del complejo glutamato deshidrogenasa de bovino con glutamato (amarillo), **NADH y GTP como inhibidores (marrón)**. Hay dos moléculas de NADH; una en el sitio activo (gris) y otra en el sitio inhibidor alostérico (cian). **El ADP también se une en este segundo sitio de NADH y activa la enzima.** Las cintas son de color de acuerdo con tres pares de dímeros con tonos de azul, rojo y verde. Tomada de Li M. *et al.* (2011).



el potasio en estado iónico, el cual posee una alta polarizabilidad, por lo que puede afectar de una mayor forma a los residuos ácidos de la enzima y modificar su conformación.

Otro punto importante es que las sales de cloruro producen un mayor efecto inhibitorio en la GDH-NAD⁺ que las sales de fosfato. Este efecto puede tener varias explicaciones. 1) El ión fosfato tiene varios potenciales de ionización; es decir, puede ir desprendiendo cada catión dependiendo del pH, por lo que a un pH de 7 predominan las especies HPO₄²⁻ y PO₄³⁻, es decir Na₂HPO₄, K₂HPO₄ y Na₃PO₄, K₃PO₄ respectivamente; en cambio el ión cloruro sólo tiene un potencial de ionización, y se esperaría una mayor concentración del catión en solución acuosa para esta última sal. 2) La solubilidad de las especies de fosfato es menor que la solubilidad de las sales de cloruro (Tabla 7), debido a esto se cree que el Na⁺ o K⁺ puede estar libremente (en estado iónico), en mayor grado en la sal de cloruro que la de fosfato y de esta manera modificar la conformación de la enzima. 3) El ión fosfato es considerado un oxianión, y Pacheco et al. (2000) estudiaron la influencia de este tipo de compuestos en la PdF0F1-ATPasa de *Paracoccus denitrificans*; se encontró que el sulfito y otros oxianiones como el fosfato y bicarbonato, producen un aumento en la actividad hidrolítica de la ATPasa, y que estos al parecer se unen en un sitio particular reduciendo los grupos tiol, lo cual produce una conformación más activa de la enzima; por lo que se cree que este mismo efecto se puede estar produciendo en la GDH-NAD⁺.

No obstante, al observar la actividad de las enzimas de ambas levaduras en sentido de desaminación oxidativa, notamos un mayor efecto de la fuerza iónica con el sodio que con el potasio; es decir, que en un sentido el potasio inhibe con mayor fuerza pero en el otro es el sodio; tal vez se deba a algún tipo de respuesta natural que favorezca que a elevadas concentraciones de Na⁺ se requiera una mayor síntesis de aminoácidos, y a elevadas concentraciones de K⁺ se necesite mayor energía para contener el estrés salino. Sin embargo, es importante aclarar que la actividad en ninguno de los dos sentidos de la reacción en presencia de las sales, se vio totalmente reprimida, esto puede producir un equilibrio entre la producción de proteínas y ADN, y la formación de energía en la levadura.



Tabla 7. Solubilidad de las sales de cloruro y de fosfato a pH 7.

Compuesto	Solubilidad	
	(g/100mL de agua)	(moles/L de agua)
NaCl	36.0	6.16
KCl	34.7	4.65
Na ₂ HPO ₄	7.5	0.53
Na ₃ PO ₄	25.8	1.57
K ₂ HPO ₄	160.0	9.18

Datos calculados a partir de Material safety data sheet (MSDS).

9.3 El ADP puede actuar como activador o inhibidor.

Se ha mostrado que el ADP en ausencia de sal actúa como un activador en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*. Al parecer esta activación se da como lo reporta Bailey *et al.* (1982), debido a que el ADP disminuye la afinidad de la coenzima y del sustrato en el sitio activo, al tener un sitio de unión cercano a ellos (Fig. 18). Pero en presencia de sales de fosfato, el efecto de activación no se observa, al contrario se da un efecto inhibitorio. Creemos que este efecto inhibitorio del ADP en presencia de sales de fosfato en los experimentos *in vitro*, se debe a la generación de un equilibrio metabólico entre la producción de aminoácidos y nucleótidos y la producción de energía al estar la levadura en estrés salino, ya que al haber un aumento en la concentración de ADP, se produjo una disminución en la actividad de la GDH-NAD⁺, es decir hay una menor producción de glutamato, para que éste sea utilizado en la síntesis de proteínas y ADN. De esta forma esta vía se mantiene suprimida para que a través de la respiración y la fermentación se forme ATP, y éste sea utilizado en algunos de los mecanismos de respuesta al estrés salino, como la Na⁺-ATPasa, que necesita de energía para funcionar. Es importante mencionar que se ha reportado que la inhibición o estimulación por ADP, GTP y ATP, es dependiente de concentración (Li *et al.*, 2011)

9.4 Promiscuidad enzimática.

Como ya se había mencionado *D. hansenii*, no cuenta en su genoma con el gen que expresa a la L-AlaDH. Al medir la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* en los extractos libres de células, observamos que esta actividad existe



aun en ausencia de sal, y que al adicionar cualquier tipo de sal la actividad disminuye. Sin embargo, se muestra que la actividad de alanina deshidrogenasa en la GDH-NAD⁺, es decir en presencia de piruvato y amonio, es distinta a la actividad de la GDH-NAD⁺ en presencia de α -cetoglutarato y amonio, en presencia de sal, ya que parece ser que ambas actividades se complementan para no perder ese equilibrio al asimilar el amonio libre. Se pensaba que la GDH-NAD⁺ en presencia de sal, se disgregaría en subunidades, y que esas subunidades funcionaban como alanina deshidrogenasa; sin embargo, parece que la actividad observada al agregar piruvato y amonio a la reacción, se debe a que el piruvato tiene la capacidad de integrarse al sitio activo de una forma similar a como lo hace el α -cetoglutarato en la GDH-NAD⁺, sin necesidad de disgregarse en subunidades, es decir la GDH-NAD⁺ se comporta como una enzima promiscua. Al observar la estructura del piruvato, podemos predecir que al interactuar con el sitio activo, se pueden producir distintos tipos de enlaces que favorezcan la unión del piruvato con éste (Fig.19).

Sería necesario purificar la GDH-NAD⁺, para corroborar esta última idea.

9.5 Comparación filogenética entre levaduras y organismos superiores.

D. hansenii se considera una levadura filogenéticamente cercana a los géneros *Clavispora*, *Ogataea* y *Candida* (Fig. 20). Sin embargo, hemos demostrado que la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii* posee un comportamiento similar pero no igual al de *S. cerevisiae* en ausencia o en presencia de sal. Ésta última no se encuentra cercana filogenéticamente al género *Debaryomyces*. Además, hemos mencionado que Peña *et al.* (1963). observaron una mayor actividad de la GDH-NAD⁺ de hígado de rata y de bovino en presencia de fosfato, con respecto a las otras sales.



Figura 19. Modelo del piruvato interaccionando con el sitio activo de la Lactato deshidrogenasa, simulando las posibles interacciones con la GDH-NAD⁺. Tomado de Graham. (2001).

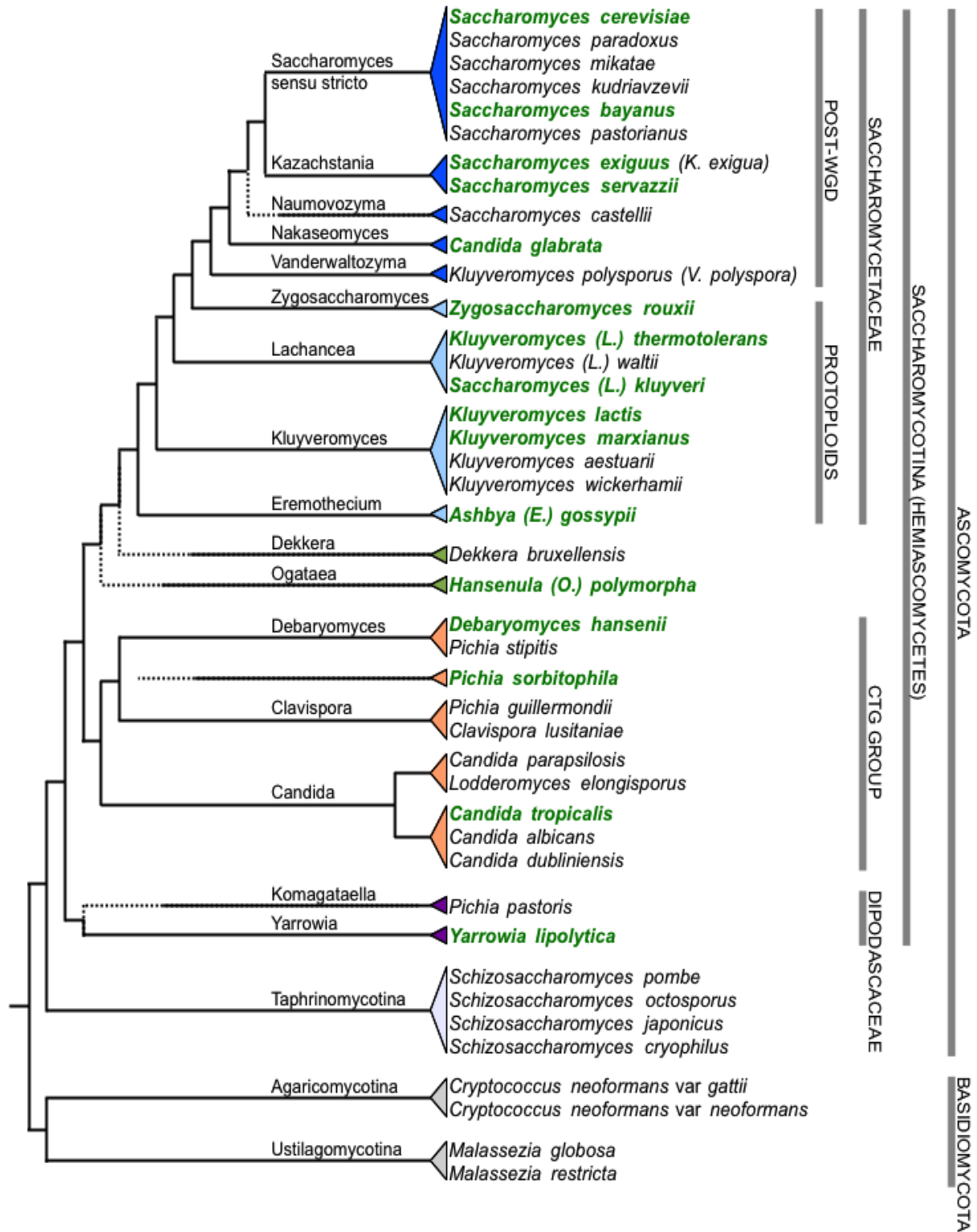


Figura 20. Árbol filogenético del Phylum Ascomycota.
Tomado de <http://genolevures.org/yeastgenomes.html#>.



Debido a esto pensamos que la GDH-NAD⁺ se ha conservado funcionalmente en presencia o ausencia de sal, a través del tiempo en algunas especies del dominio Eukarya, incluyendo a organismos superiores, a pesar de las distancias evolutivas que existen entre cada uno de ellos (Fig. 21). Por lo que creemos que de cualquier forma esta enzima sigue estando relacionada con la resistencia a la sal.

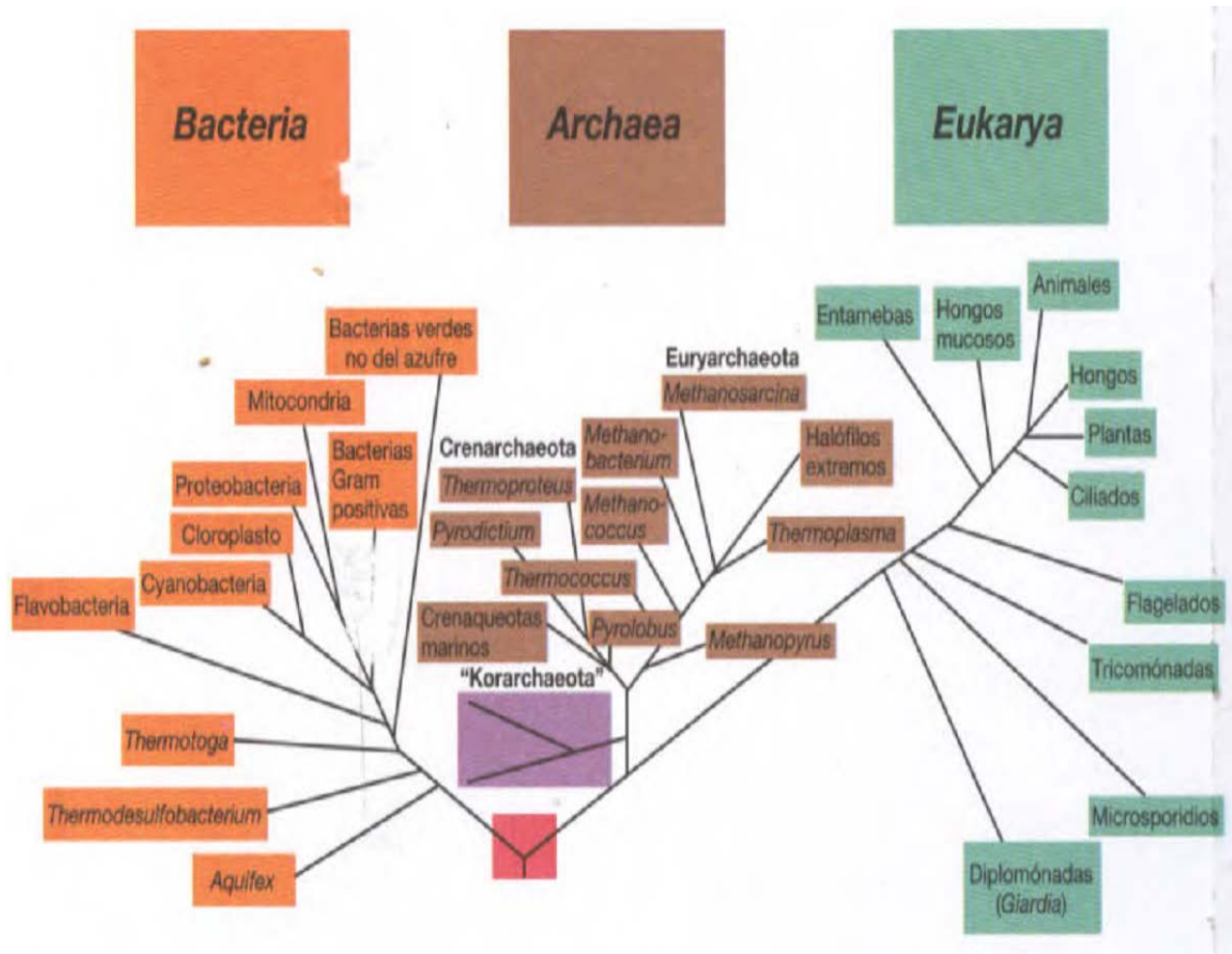


Figura 21. Árbol filogenético universal. Tomado de Madigan. (2009).



10. CONCLUSIONES

- ❖ La GDH-NAD⁺ de ambos géneros de levadura presenta actividad en los dos sentidos de la reacción, aún en presencia de sal.
- ❖ El comportamiento de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*, a través de la reacción de aminación reductiva de α -cetoglutarato, en presencia de sales de fosfato o cloruro de sodio o potasio, es muy similar a la actividad de la enzima de *S. cerevisiae*, inclusive esta última llega a estimularse a bajas concentraciones de sal.
- ❖ La fuerza iónica producida por las sales de cloruro afecta más la actividad de la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*, que las sales de fosfato.
- ❖ La asimilación de NH₄⁺ en *D. hansenii* en condiciones de estrés salino, parece darse a partir de un equilibrio entre las actividades de la GDH-NAD⁺ para la formación de glutamato y alanina.
- ❖ La GDH-NAD⁺ se ha conservado funcionalmente a través del tiempo en algunas especies del dominio Eukarya; incluyendo a organismos superiores, a pesar de las distancias evolutivas que existen entre cada uno de ellos.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Purificar la GDH-NAD⁺ de *D. hansenii*, y comprobar si presenta actividad de alanina deshidrogenasa, en ausencia y presencia de sal.
- ❖ Expresar los genes *DhGDH2*, *DhGLN1*, *DhGLT1*, en presencia de sales de fosfato.



12. BIBLIOGRAFÍA

- Alba-Lois, L., Segal, C., Rodarte, B., Valdés-López, V., De Luna, A. y Cárdenas, R. (2004). NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol.* 48: 68-72.
- Adler, L. y Gustafsson, L. (1980). Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 124: 123-130.
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro-Dias, M. C. y Ramos, J. (2001). Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 183: 3251-3255.
- Bailey, J. S., Bell, E. T. y Bell, J. E. (1982). Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 257:5579–5583.
- Bonete, M., Pérez-Pomares, F., Díaz, S., Ferrer, J. y Oren, A. (2003). Occurrence of two different glutamate dehydrogenase activities in the halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Microbiology Letters.* 226: 181-186.
- Botsford J. L., Alvarez M., Hernandez R., Nichols R. (1994). Accumulation of glutamate by *Salmonella typhimurium* in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2568–2574.
- Botsford J. L., Lewis T. A. (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol.* 52: 488–496.
- Calahorra, M., Sánchez, N. S. y Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research.* 9: 1293-1301.
- Coury L. A., McGeoch, J. L. M., Guidotti G. y Brodsky J. L. (1999). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not sequester chloride, but can express a functional mammalian chloride channel. *Microbiol Lett.* 179: 327–332.
- Frieden C. (1958). The dissociation of glutamate dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH). *Biochim et Biophys Acta.* 27: 431–432.
- Frieden, C. (1959). Glutamic Dehydrogenase I. The effect of coenzyme on the sedimentation velocity and kinetic behavior. *J. Biol. Chem.* 234: 809-814.
- Frieden, C. (1965). Glutamate dehydrogenase VI. Survey of purine nucleotides and other effects on the enzyme from various sources. *J Biol Chem.* 240:2028–2037.
- Génolevures Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts. <http://www.genolevures.org/> consultado en Agosto de 2013.
- Graham L. P. (2001). An introduction to Medicinal Chemistry. Second Edition. Oxford University Press. Great Britain. pp.40-47.
- Guerrero C. A., Aranda C., DeLuna A., Filetici P., Riego L., Anaya V. H., González A. (2005). Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet.* 47: 163–171.
- Keradjopoulos, D. y Holldorf, A. W. (1979). Purification and properties of *Halobacterium salinarium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 570: 1-10.



- Kinnaird, J. H. y Fincham, J. R. S. (1983). The complete nucleotide sequence of the *Neurospora crassa* am (NADP-specific glutamate dehydrogenase) gene. *Gene*, 26: 253-260.
- Koberstein R., y Sund H. (1973). The influence of ADP, GTP and L-glutamate on the binding of the reduced coenzyme to beef-liver glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 36:545–552.
- Koshland D. E. J. (1996). The structural basis of negative cooperativity: receptors and enzymes. *Curr Opin Struc Biol*. 6: 757–761.
- Li M., Li C., Allen A., Stanley C. A. y Smith T. J. (2011). The structure and allosteric regulation of glutamate dehydrogenase. *Neurochem Int*. 59(4): 445–455.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem*. 193: 265-275.
- Lucas, C., da Costa, M. y Van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 6: 187-191.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. *Brock, Biología de los microorganismos*, 12^a ed; Pearson Addison Wesley: España, 2009.
- Markwell, M., Haas, S., Bieber, L. y Tolbert N. (1978). A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Sample. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210.
- Material safety data sheet (MSDS).
<http://www.qmaxsolutions.com/qhse/msds.html> consultado en Abril de 2014.
<http://gtm.net/es/productosyservicios/c.html> consultado en Abril de 2014
<http://ctr.com.mx/hojaseg.php> consultado en Abril de 2014.
- Melzi-D'eril, G., Dalziel, K. 1973. Negative cooperativity in glutamate dehydrogenase. Coenzyme binding studies. *Biochem J*. 130: 3P.
- Nakatani, Y., Scheneider, M., Banner, C., y Freese, E. (1988). Complete nucleotide sequence of human glutamate dehydrogenase cDNA. *Nucleic Acids Research*. 16: 6237.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5^a ed; Omega: Barcelona, 2007. Pp 851-860.
- Neves, M. L., Oliveira, R. P. y Lucas, C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*. 143: 1133-1139.
- Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv. Fur. Mikrobiologie*. 62: 358-372.
- Norkrans, B. y Kylin, A. (1969). Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt. *J. Bacteriol*. 100: 836-845.
- O'Connor, R. J. y Halvorson, H. O. (1961). L-alanine dehydrogenase: a mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol*. 82: 706-713.
- Pacheco F. M., García J. J., Rodríguez-Zavala J. S. y Moreno-Sánchez R. (2000). Sulfite and membrane energization induce two different active states of The *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase. *Eur. J. Biochem*. 267: 993-1000.



- Peña-Díaz A., Gómez-Puyou A. y Guzmán-García A. (1963). Effect of Ions on the Glutamic Dehydrogenase Reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 100: 426-430.
- Prista, C., Almagro A., Loureiro-Dias, M. C., Ramos J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol*. 63: 4005–4009.
- Prista, C., González-Hernandéz, J.C., Ramos, J. y Loureiro-Dias, M. C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*. 153: 3034-3043.
- Raymond, J. (2005). The Evolution of Biological Carbon and Nitrogen Cycling—a Genomic Perspective. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 59: 211-231.
- Rice, D. W., Hornby, D. P., y Engel, P. C. (1985). Crystallization of an NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. *J. Mol. Biol*. 181: 147-149.
- Rife, J. E. y Cleland, W. W. (1980). Determination of the chemical mechanism of glutamate dehydrogenase from pH studies. *Biochemistry*. 19: 2328-2333.
- Sánchez, N. S., Arreguín, R., Calahorra, M. y Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*. 8: 1303-1312.
- Sánchez, N. S. (2014). Tesis de Maestría “Efecto del pH elevado y la sal sobre *Debaryomyces hansenii*”. Pag. 11.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C. y Peña, A. (2006). The glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23: 361–374.
- Sanwal, B. D. y Lata, M. (1961). The occurrence of two different glutamic dehydrogenases in *Neurospora*. *Can. J. Microbiol*. 7: 319-328.
- Serrano, R. (1980). Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem*. 105: 419–424.
- Siranosian, K. J., Ireton, K. y Grossman, A. D. (1993). Alanine dehydrogenase (ald) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 175: 6789-6796.
- Smith, E. L., Austen, B. M., Blumenthal, K. M. y Nyc, J. F. (1975). Glutamate dehydrogenase. En: *The enzymes*. 11: 293-367. Edited by P.D. Boyer. Academic Press. New York.
- Sund, H. (1968). The pyridine nucleotide depended dehydrogenases. En: *Biological Oxidations*. (Ed. T. P. Singer) pp. 641-692. Wiley, New York.
- Thomé-Ortiz, P. E., Peña, A. y Ramírez, J. (1998). Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*. 14: 1355-1371.
- Tomkins, G. M., Yielding, K. L. y Curran, J. F. (1962). The Influence of Diethylstilbestrol and Adenosine Diphosphate on Pyridine Nucleotide Coenzyme Binding by Glutamic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. 237: 1704-1708.
- Tomkins, G. M., Yielding, K. L., Curran, J. F., Summers, M. R. y Bitensky, M. W. (1965). The Dependence of the Substrate Specificity on the Conformation of Crystalline Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. 240: 3793-3798.



- Yielding, K. L. y Tomkins, G. M. (1959). Inhibition of the enzymic oxidation of DPNH by steroid hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45: 1730-1739.
- Yielding, K. L., Tomkins, G. M., Munday J. S. y Curran J. (1960). The effects of steroid hormones on the glutamic dehydrogenase reaction. Biochem. and Biophys. Research Communications. 2: 303-306.
- Yielding, K. L., Tomkins, G. M., Trundle, D. S. (1964). On the mechanism of inhibition of glutamate dehydrogenase by NADH and NADPH. Biochim. Biophys. Acta. 85: 342-345.