

2 E. No. 93



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
DESHIDROGENASA GLUTAMICA DEL MAIZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. PATRICIA TERESA RESENDIZ RESENDIZ



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.

INDICE

	PAGS.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I INTRODUCCION	3
II ANTECEDENTES	7
III MATERIALES Y METODOS	17
IV RESULTADOS Y DISCUSION	26
V CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39

ABREVIATURAS

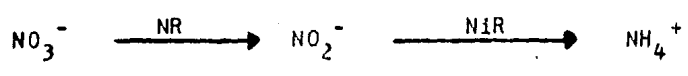
- Plantas C₃ son las que fijan el CO₂ en forma primaria por medio de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa.
- Plantas C₄ son las que fijan el CO₂ en forma primaria por medio de la enzima piruvato carboxilasa.
- GDH Deshidrogenasa glutámica.
- GS Glutamino sintetasa
- GOGAT Glutamato sintasa.
- AS Asparagino sintetasa.
- αKG αcetoglutarato.
- Glu Acido glutámico.
- Gln Glutamina.
- Asp Acido aspártico.
- Asn Asparagina.
- αk-ac αcetoacidos.
- αk-a-ac αcetoaminoacidos.
- TA Transaminasas.
- ASB Albúmina sérica bovina.
- NADH Nicotínamida adenín dinucleótido reducido.
- NAD⁺ Nicotínamida adenín dinucleótido oxidado.
- NADPH Nicotínamida adenín dinucleótido fosfato reducido.
- NADP⁺ Nicotínamida adenín dinucleótido fosfato oxidado.

RESUMEN

La deshidrogenasa glutámica de hojas de maíz esta compuesta por 7 isoenzimas, con un peso molecular promedio de 260,000 daltones cada una; la fracción D-1A2G se purificó 341 veces; a esta fracción se le realizaron estudios de caracterización encontrándose: para la actividad aminativa dos puntos de quiebre uno a los 25 y otro a los 47°C con energías de activación de 26.1 y 7.2 kilocalorías/mol respectivamente, mientras que la actividad desaminativa mostró sólo uno a los 48°C con una energía de activación de 10.7 kilocalorías/mol; un pH óptimo de 8.2 para la actividad aminativa y de 9.0 para la desaminativa; el Ca^{2+} 1 mM es el que más activó ambas actividades, luego le siguió el Mg^{2+} 1 mM; el Ni^{2+} y el Zn^{2+} a una concentración 1 y 10 mM inhibieron la actividad aminativa y activaron la desaminativa; el Co^{2+} 1 mM inhibió la actividad aminativa un 13%, esta inhibición fue menor que la obtenida con Ni^{2+} y Zn^{2+} , mientras que la actividad desaminativa fue inhibida completamente lo cual no sucedió con Ni^{2+} ni con Zn^{2+} ya que con estos esta actividad se activó; en cuanto a agentes quelantes, el EDTA a una concentración 4 mM y con 5 y 10 minutos de incubación inhibió la actividad aminativa un 76.15%, a una concentración 1 mM y 5 minutos de incubación inhibió la actividad aminativa un 52.45%, y con 10 minutos de incubación la inhibió un 60.26%, el EDTA 1 y 4 mM y con 5 y 10 minutos de incubación no tuvo efecto sobre la actividad desaminativa; la actividad aminativa inhibida por el EDTA se recuperó parcialmente por la adición de Ca^{2+} 1 mM; con respecto a su antigenicidad de la GDH de raíz de maíz se observó que poseen determinantes antigenicos diferentes.

I INTRODUCCION

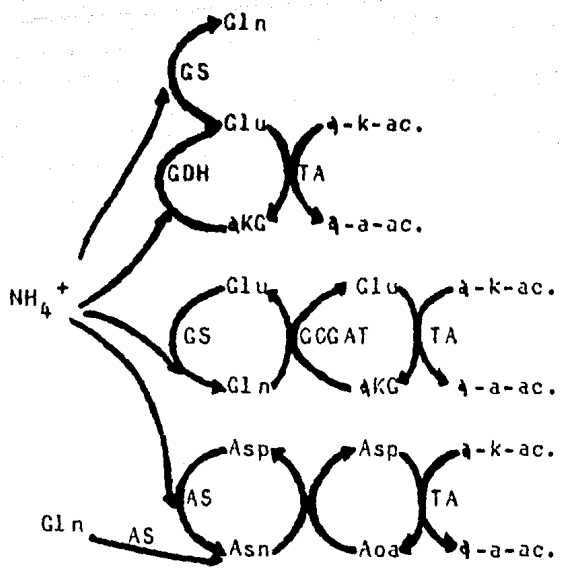
El nitrógeno es generalmente utilizado por las plantas superiores en forma de nitratos, aunque algunas veces lo toman como sales de amonio que pueden provenir de los fertilizantes sintéticos. El nitrato es la forma más favorable para ser asimilada por las plantas, sin embargo los nitratos no pueden ser directamente incorporados a las moléculas orgánicas de las plantas, sino que deben ser convertidos primeramente en amonio, mediante las enzimas: nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) según la siguiente secuencia de reacciones:



El amonio puede ser incorporado a las moléculas orgánicas por dos o tres vías diferentes:

- 1) Vía de la deshidrogenasa glutámica (GDH).
- 2) Vía de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT).
- 3) Vía de la asparagino sintetasa (AS).

En el siguiente esquema se muestra la incorporación del amonio a las moléculas orgánicas de las plantas:



Estas enzimas por consiguiente deben estar funcionando de una manera coordinada para proveer el nitrógeno orgánico necesario para el crecimiento y desarrollo de las plantas (1).

La GDH juega un papel significativo en el metabolismo nitrogenado ya que cataliza la conversión del α-cetoglutarato en ácido glutámico y por lo tanto convierte al amonio en nitrógeno orgánico, además de que es la única enzima que conecta directamente el metabolismo del nitrógeno con el metabolismo de los carbohidratos.

Se han encontrado tres formas de GDH con diferente especificidad por el cofactor: la (L-glutamato: NAD⁺ oxidorreductasa (desaminante), E. C. 1.4.1.2.); la (L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidorreductasa (desaminante), E. C. 1.4.1.3.); y la (L-glutamato: NADP⁺ oxidorreductasa (desaminante), E. C. 1.4.1.4.).

Sin embargo varias enzimas, incluyendo la de raíz de chícharo (2), que usa solamente NAD^+ en la dirección desaminativa si presentan actividad con NADPH en la dirección aminativa siendo alrededor del 10% de la velocidad obtenida con NADH .

La GDH E. C. 1.4.1.2. se ha purificado a homogeneidad a partir de raíces de chícharo por Pahlich y Joy en 1971 (2), de plántulas de cowpea por Fawole en 1977 (3) y de nódulos de lupino (4).

La GDH E. C. 1.4.1.3. está presente en los cloroplastos de hojas de haba (5), en tanto que la GDH E. C. 1.4.1.4. se ha encontrado en los cloroplastos de la alga marina (Caulerpa simpliciuscula) (6) y en los protoplastos obtenidos de cultivos de tabaco (7).

Se ha demostrado que los nucleótidos NAD^+ y NADP^+ se unen en un punto específico del sitio activo de la enzima (8), de tal manera que la presencia de estas tres actividades sugiere o tres isoenzimas o tres cófómeros con diferente actividad por el cofactor.

Entre las características que se han investigado de la GDH de plántulas está la de que es una metaloenzima (2,9,10,11,12); que tiene grupos sulfhidrilos indispensables para su actividad (10, 12,13,14,15); es activada por iones divalentes (9,10,12,16); además hay quien sugiere que el Ca^{2+} puede ser un modulador de la actividad de la GDH-HADH de la mitocondria externa in vitro y se ha sugerido que la calmodulina está involucrada en este proceso (17). Joy (16) encontró que el Zn^{2+} juega un papel importante en la regulación de la actividad de la GDH, ya que a bajas concentraciones (0.30 mM) causaba un aumento en la actividad dependiente de NADH y a altas concentraciones la inhibía, en cambio Pahlich (18) observó que era fuertemente inhibida por Zn^{2+} .

La GDH tiene un peso molecular de $208,000 \pm 10,000$ (2), 250,000 (10), 270,000 (12), de 300,000 a 350,000 (20) y de 230,000 (19); tiene un pH óptimo para la reacción aminativa y desaminativa de

8.0 y 8.0 (2), 8.2 y 9.2 (12), 8.3 y 8.9 (20), 7.5 y 10.0 (21),⁶
8.0 y 9.3 (22) y de 7.5 a 8.4 y de 9.0 a 10.0 (23) respectivamente. Nagel y Hartman (24) encontraron un pH óptimo de 8.0 para la reacción aminativa y para la desaminativa este pH depende de la concentración de glutamato y va de 8.5 a 9.5, cuando la concentración de glutamato va de 0.02 a 0.22 M. El patrón de isoenzimas no sólo difiere de acuerdo al organelo investigado (18,25,26), sino que también es influenciado por la temperatura (8) y los parámetros de desarrollo (10,27).

En maíz se ha estudiado a la GDH de hojas (14) y de raíz (28), sin embargo, la GDH no fue purificada exhaustivamente, de tal manera que para poder determinar sus características y regulación in vitro se requiere de una purificación hasta homogeneidad con el fin de poder comparar sus características con las de raíz, previamente purificada en nuestro laboratorio por Loyola V., V. M. (12). Por ello el objetivo de este trabajo es purificar a la GDH de hojas de maíz y determinar sus características fisico-químicas y de regulación in vitro.

II ANTECEDENTES

La GDH se ha investigado en varias plantas de interés nutricional para el hombre y los animales, para una mejor comprensión de los datos con que contamos ahora, se agruparon en base al tipo de fijación de CO_2 que efectúan.

PLANTAS C_3 MONOCOTILEDONEAS Y DICOTILEDONEAS

Entre las plantas C_3 monocotiledóneas investigadas se encuentran: arroz (*Oryza sativa* L.) (29,30), trigo (*Triticum aestivum* L.) (31, 32) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (33,34). En arroz, la GDH se ha encontrado tanto en citoplasma como en la mitocondria, la GDH del citoplasma sólo es activa con NAD^+ ; cuando las plántulas crecen en presencia de amonio aumenta la actividad de la GDH y esto es debido a la síntesis de novo de una nueva GDH que además de poder funcionar con NAD^+ , también lo hace con NADP^+ (29); sin embargo, más tarde Bielawski y Rafalski (30) encontraron que esta nueva enzima que se sintetizaba cuando se riegan las plántulas con amonio es la misma que existía antes.

En trigo, Dalling et al. (31) encontraron que la GDH de raíz está localizada en la mitocondria y funciona tanto con NAD^+ como con NADP^+ , mientras que Kretovich et al. (32) determinaron que hay isoenzimas que funcionan exclusivamente con NAD^+ e isoenzimas que funcionan tanto con NAD^+ como con NADP^+ y al igual que en otras especies el amonio incrementa el nivel de GDH tanto en raíz como en hoja. En cebada, Suzuki y Oaki encontraron, al igual que en arroz, que la GDH es una enzima mitocondrial (33), más sin embargo a diferencia de la de arroz muestra actividad tanto con NAD^+ como con NADP^+ (34).

Entre la amplia variedad de plantas C_3 dicotiledóneas en las que se ha investigado a la GDH se encuentran: chícharo (Pisum sativum L.) (2,9,16,18,19,21,27,36,37), soya (Glycine max Merrill) (20, 22,37), espinaca (Spinacea oleracea L.) (13,38), lechuga (Lactuca sativa L.) (39), calabaza (Curcubita moschata Poir) (10), haba (Vicia faba cv. minor) (5,40), frijol (Phaseolus vulgaris L.) (5,33,39), alfalfa (Medicago sativa L.) (24,26) y remolacha (Beta vulgaris) (23).

De todas estas plantas chícharo es la más estudiada, en 1956 Davies (35) localizó en la fracción mitocondrial a la GDH de hipocotilos de chícharo: Thurman en 1965 (27) observó que las diferentes partes de las plántulas de chícharo parecían tener diferentes isoenzimas de GDH, las cuales podían cambiar con el tiempo, Yamasaki y Suzuki (21) purificaron 10 veces la GDH extraída de plántulas de chícharo de 3 días y encontraron que el pH óptimo para la reacción aminativa era de 7.5 mientras que para la desaminativa era de 10.0, además observaron que era una metaloenzima ya que se inhibía con EDTA y la actividad se recuperaba con la adición de iones divalentes. La GDH de raíz de chícharo fue la primera en ser purificada a homogeneidad por Pahlich y Joy en 1971 (2), se purificó 1250 veces y se le determinó un peso molecular de 208,000; la enzima mostró tanto actividad aminativa (NADH y NADPH) como desaminativa (NAD^+) y el pH óptimo para ambas actividades fue alrededor de 8.0. El EDTA (1 mM) inhibió la actividad dependiente de NADH en un 70%, la NAD^+ en un 20% y la NADPH no fue afectada. Joy en 1973 (16) encontró que la adición de Zn^{2+} 0.30 mM causaba un aumento en la actividad dependiente de NADH tanto de la fracción soluble como de la mitocondrial, por lo que concluyó que el Zn^{2+} jugaba un papel importante en la regulación de la actividad de la GDH: por otro lado también la activan Ca^{2+} y Mn^{2+} , en tanto que Mg^{2+} casi no la alteraba. Hartman en 1973 (25) determinó dos factores electroforéticos para la GDH, uno se encontraba en los cotiledones y otro en las raíces. Pahlich en 1975 (18) observó que la GDH extraída de plántulas de chícharo era

fuertemente inhibida por Zn^{2+} , hecho contrario a lo encontrado por Joy (16). Garland y Dennis en 1977 (9) purificaron la GDH mitocondrial de tallo de plántulas de chícharo 487 veces; la enzima es activa por adición de iones divalentes, obteniéndose un máximo con Ca^{2+} 1.0 mM, Zn^{2+} 0.2 mM y Mn^{2+} 1.5 mM, mientras que el EDTA 0.025 mM inhibía la reacción aminativa un 57%; por estudios cinéticos con esta enzima se propuso un mecanismo semi al azar en el que NADH entra primero al sitio activo de la enzima y luego al azar a α KG y amonio siendo la salida ordenada para el ácido glutámico y el NAD^+ .

Pahlich et al. en 1980 (36) obtuvieron anticuerpos monoespecíficos contra la principal banda de actividad de la GDH de plántulas de chícharo, para compararla inmunológicamente con las otras bandas, y observaron que todas contenían los mismos determinantes antígenicos, y mientras que con la GDH de maíz y arroz también están relacionados serológicamente, la GDH de hígado de res no mostró relación serológica y tampoco la GDH-NADP⁺ de Candida utilis (una levadura).

Nauen y Hartman en 1980 (19) encontraron que las isoenzimas de la GDH de plántulas de chícharo están localizadas exclusivamente en la matriz mitocondrial. La GDH de plántulas de chícharo purificada a homogeneidad tiene un peso molecular de 230,000 y esta compuesta de 4 subunidades idénticas con un peso molecular de 55,500 arregladas en una estructura tetraédrica.

En soya al igual que en chícharo también se ha estudiado a la GDH en diferentes tejidos. En 1969 Yue (37) determinó que la GDH de soya de origen mitocondrial tiene dos isoenzimas, mientras que King y Wu en 1971 (22) aislaron la GDH mitocondrial dependiente de NAD^+ de cotiledones de plántulas de soya y la purificaron 250 veces y obtuvieron un pH óptimo de 8.0 para la reacción aminativa y de 9.3 para la reacción desaminativa. También determinaron una inhibición por EDTA de las actividades aminativa y desamina-

tiva, si bien esta última actividad en un menor porcentaje. Por otro lado determinaron que la mayor parte de la actividad de la GDH está localizada en la mitocondria ya que el 70% de la GDH se encuentra en la fracción particulada; posteriormente Mckenzie y Lees en 1981 (20) aislaron 3 formas de GDH de soya: la (I) se encontró solamente en semillas y es activa con ambos nucleótidos y es la única que mostró considerable actividad con NADP^+ , la (II) se localizó en los cloroplastos y mostró menor actividad con NADP^+ respecto a NAD^+ pero uso preferencialmente NADPH en la dirección aminativa, la (III) se determinó en las mitocondrias y fue específica para NAD^+ , estas tres formas no mostraron diferencias en cuanto a su pH óptimo que fue de 8.3 para la reacción aminativa (NADH) y de 8.9 para la reacción desaminativa (NAD^+), tuvieron un peso molecular de 300,000 a 350,000, especificidad de sustrato con respecto al Mg^{2+} ó al L-glutamato, distinguiéndose estas tres formas de enzima en base a su especificidad hacia el nucleótido utilizado.

En cuanto a la GDH de espinaca existen pocos estudios, Hageman en 1974 (38) encontró que la GDH mitocondrial es dependiente de NADH , mientras que la de la fracción de los cloroplastos es dependiente de NADPH ; en 1978 el mismo autor (13) observó que la actividad de la GDH en hojas de espinaca era estimulada por la adición de mercaptoetanol 0.14 M y permanecía constante hasta una concentración 0.56 M después de la cual decrecía.

En 1972 Lea y Thurman (39) compararon la GDH mitocondrial con la cloroplástica de hojas de lechuga y encontraron que la fracción mitocondrial se solubilizaba por ruptura osmótica o por tratamiento de congelación y de descongelación, en cambio la cloroplástica sólo se solubilizaba cuando se trataba con Tritón-X-100.

En calabaza también ha habido pocos estudios, Chou y Splittstoesser en 1972 (10) aislaron la GDH tanto de la fracción soluble como de la mitocondrial de cotiledones de calabaza y encontraron una mayor

actividad en la fracción soluble, ambas enzimas usaron NAD(H) y NADP(H) pero el uso de NAD(H) fue el predominante; el pH óptimo para la reacción aminativa fue de 8.0. Altas concentraciones de amonio y de 4KG inhibieron a la enzima, también fue inhibida por EDTA 1.0 mM (96%), 0.1 mM (94%), 0.01 mM la inhibió un 90% y 0.001 mM un 14%, recuperándose la actividad por la adición de Ca^{2+} , Mn^{2+} ó Cu^{2+} . Y mientras que la GDH soluble era activada por iones metálicos la mitocondrial no lo era. La enzima fue también inhibida por p-hidroximercuribenzoato y recuperó su actividad por la adición de glutatión, deduciéndose con ésto que es una enzima que posee grupos sulfhidrilos que son indispensables para su actividad; se le determinó un peso molecular de 250,000. Durante la germinación las isoenzimas solubles aumentan de 1 a 7 mientras que en la fracción mitocondrial sólo se ha encontrado una isoenzima la cual permanece todo el tiempo y ésta fue idéntica a una de las isoenzimas solubles.

En cuanto a la haba, esta tiene una serie de estudios muy interesantes, Thurman (27) purificó parcialmente a la GDH de plántulas y determinó por electróforesis en gel de poliacrilamida que había 7 bandas, de las cuales 5 eran intensas y 2 débiles. En 1968 Leech y Kirk (5) fueron incapaces de detectar actividad significativa de GDH en cloroplastos de hojas de haba, sin embargo separaron una GDH de origen mitocondrial que utilizaba NAD^+ como cofactor. En 1977 Fawole (40) examinó los cotiledones de 7 variedades de Vicia faba, purificó 49 veces la GDH- NAD^+ y 6 veces la GDH- NADP^+ y determinó un pH óptimo, para la reacción con NAD^+ de 9.2 y para la reacción con NADH de 7.5 en tanto que la reacción NADPH fue de 6.0; la actividad se encontró tanto en la fracción particulada como en la soluble en una proporción 50:1. las isoenzimas de la GDH dependiente de NAD^+ se examinaron por electróforesis en gel de poliacrilamida dando 7 isoenzimas siendo constante este número durante la germinación y sólo hubo una variación en la intensidad de las bandas.

En frijol, Suzuki (33) encontró que la GDH es una enzima exclusivamente mitocondrial, en tanto que Leech y Kirk (5) observaron que había una GDH dependiente de NADP^+ localizada exclusivamente en el sistema laminar de los cloroplastos. Por otro lado Lea y Thurman determinaron dos GDHs en los hipocotilos de frijol, una en la fracción del sobrenadante y otra mitocondrial y por técnicas electroforéticas determinaron 7 isoenzimas de la GDH dependientes de NAD^+ (39).

En cuanto a la alfalfa, en 1973 Nagel y Hartmann (24) encontraron dos patrones de GDH uno está presente en los cotiledones de la semilla (GDH-I) y el otro en la raíz (GDH-II); sin embargo los brotes tienen una mezcla de ambas isoenzimas. Un patrón similar de isoenzimas de la GDH se encontró en chícharo (18,25). La existencia de tejidos específicos para las diferentes formas de la enzima puede estar relacionada con la diferenciación celular, compartimentalización subcelular o funciones fisiológicas, debido a la gran diferencia en el metabolismo nitrogenado entre la raíz y los tejidos de almacenamiento durante la movilización del nitrógeno de reserva. Esto sugiere que la GDH-II puede estar involucrada en procesos anabólicos mientras que la GDH-I puede estarlo en procesos catabólicos. En 1980 los mismos autores (24) purificaron 1520 veces la GDH de semillas (GDH-I) y 92 veces la GDH de raíz (GDH-II), encontrando un patrón de 7 isoenzimas para la GDH-I y de 4 isoenzimas para la GDH-II, este patrón permaneció constante durante todo el proceso de purificación, una isoenzima era común en ambos patrones, el pH óptimo para la reacción con NADH fue de 8.0 a 8.5 en tanto que para la reacción con NAD^+ fue de 8.5 a 9.5 y varió dependiendo de la concentración de glutamato en el rango de 0.02 a 0.22 M este comportamiento fue común en ambas isoenzimas; la GDH-I mostró tres veces más actividad con Ca^{2+} y fue parcialmente inactivada con EDTA y no pudo ser reactivada por la adición de Ca^{2+} .

Nesselhut en 1980 (23) investigó la GDH de remolacha y determinó que era activada por NAD(H) y por NADP(H) , con un peso molecular

de 260,000 y un pH óptimo para la reacción aminativa de 7.5 a 8.4 y el de la desaminativa de 9.0 a 10.0.

PLANTAS C₄ MONOCOTILEDONEAS Y DICOTILEDONEAS

Dentro de las plantas C₄ dicotiledóneas, la gomfrena (Gomfrena globosa L.) es la única en la que se ha determinado a la GDH, Mellor y Treguna (41) determinaron que se encuentra en las mitocondrias de las células del mesófilo y en las de la vaina vascular y que podía utilizar tanto NAD⁺ como NADP⁺.

Entre las plantas C₄ monocotiledóneas que se han investigado está el maíz (Zea mays L.) (11,12,14,28,37,41-46) y Agave americana (1,15).

Bulen en 1956 (14) purificó y caracterizó a la GDH de hojas de maíz de 35 a 50 días de edad; si bien su purificación fue parcial (56 veces) encontró que el pH óptimo de la reacción aminativa era de 8.1; que la enzima era específica para NAD⁺ y que sufría una inhibición del 35% cuando se le adicionaba p-cloromercuribenzoato 0.0025 M y se reactivaba completamente por la adición de glutatión a una concentración final de 0.01 M, estos resultados indican que la GDH es una enzima que posee grupos sulfhidrilos esenciales para su actividad.

Posteriormente en 1964 Yakovleva y Kretovich (28) purificaron 16 veces la GDH de raíz de maíz y encontraron dos formas de la enzima que podían ser isoenzimas, una que se encuentra en las estructuras precipitadas a 6,500 g mientras que la otra está presente en el líquido sobrenadante después de centrifugar a 30,000 g, las dos isoenzimas poseen propiedades fisicoquímicas diferentes ya que mientras que la forma soluble pasa completamente a través de la columna de fosfato de calcio, la forma particulada si se retiene en la columna: los mismos autores en 1966 (42) purificaron 86 veces a la GDH de plántulas de maíz de 10 días, separaron la frac-

ción soluble de la mitocondria por la propiedad de éstas frente a la columna de fosfato de calcio, posteriormente aplicaron por separado estas fracciones a una columna de DEAE celulosa y eluyeron la enzima aumentando la fuerza iónica, obtuvieron 5 picos con actividad, sin embargo no consideraron que estas 5 fueran isoenzimas, sino sólo consideraron 2 isoenzimas, o sea las que se obtuvieron en el fraccionamiento con la columna de fosfato de calcio, la enzima era activa con NADH y con NADH en una relación 8:1.

Más tarde Ritenour (43) estudió la localización de la GDH en hojas de maíz. usando técnicas de aislamiento acuoso y no acuoso, y encontró que el 70% está localizado en la mitocondria, el 23% en el citoplasma y el 17% en los cloroplastos. Mellor y Tregunna (14) aislaron la GDH de hojas de maíz de 3 semanas y encontraron que es una enzima puramente mitocondrial y que es activa tanto con NADH como con NADPH; Folikarpochkina en 1975 (11) reportó que la GDH de hojas de maíz de 3 días de crecimiento es sensible a los compuestos quelantes: el EDTA 1 mM incubado por diez minutos con la enzima inhibió un 40% de la actividad, 4 mM de EDTA inhibió el 62% y zincón a una concentración de 0.34 mM la inhibió el 88% y la pérdida de la actividad dependió tanto de la temperatura como del tiempo de incubación, lo que sugiere que es una metaloenzima.

En 1969 Yue (37) usando técnicas electroforéticas investigó las isoenzimas de la GDH tanto de hojas como de embriones de maíz y encontró 7 bandas para ambas y detectó cambios en el patrón de isoenzimas en la presencia de amonio para la raíz o de la oscuridad para las hojas. En 1979 Nicklisch (44) también encontró 7 bandas de la GDH de raíz de maíz, con un mismo peso molecular de 250,000 daltones pero con diferente carga. En 1982 Quetz (45) midió la actividad de la GDH de raíz de maíz tantó con NADP⁺ como con NAD⁺ y comparó estas resultados con la GDH de plántulas, encontrando que la GDH-NADPH es de 5 a 7 veces más activa en raíz que en plántulas y que la GDH-NADH es de 4 a 5 veces mayor en raíz que en plántu-

las, además observó que la actividad de la GDH-NADH decreció en presencia de nitrato y luego subió al mismo nivel, en cambio en presencia de amonio aumenta.

Los datos más recientes que se tienen de la GDH de raíz de maíz son los de Loyola V., V. M. (12) quien la purificó 144 veces y realizó estudios de caracterización, encontrando que la GDH era activa con NADH, NADPH y NAD⁺ (con NADP⁺ también era activa sólo que esta actividad se perdió en el primer paso de purificación), la relación de actividad NADH/NADPH fue de 5.3 mientras que la relación NAD⁺/NADP⁺ fue de 2.74. El EDTA inhibió en diferente manera la actividad aminativa y la desaminativa a concentraciones menores de 140 μ M y esta concentración inhibió el 100% ambas actividades. La recuperación de la actividad por iones divalentes después de incubación con EDTA fue bastante específica para Ca²⁺, Zn²⁺ y Co²⁺. La GDH también fue inhibida por p-hidroximercuribenzoato y la inhibición fue revertida por glutatión sugiriendo que uno o más grupos sulfhidrilos son esenciales para su actividad. Separó 6 diferentes fracciones de GDH a lo largo del proceso de purificación las cuales muestran actividad con los tres cofactores; por técnicas de filtración en gel obtuvo un peso molecular de la GDH de aproximadamente 270,000 daltones. Realizó curvas de Arrhenius y observó que la actividad aminativa muestra diferencias fundamentales en su dependencia respecto de la temperatura con la actividad desaminativa, pues mientras que la actividad desaminativa muestra un muy bien definido punto de quiebre a 46^oC la actividad aminativa muestra dos, uno a 39^oC y el otro a 56^oC; el pH óptimo para la reacción aminativa fue de 8.2 y para la desaminativa fue de 9.2.

Otra planta C₄ monocotiledónea investigada es el Agave americana Ramirez et al. (46) encontraron que la GDH de hojas de Agave americana es más activa con NADH que con NADPH para la reacción aminativa y sólo es activa con NAD⁺ para la reacción desaminativa, los iones divalentes no tienen efecto sobre su actividad, el úni-

co que la afecta es el Zn^{2+} el cual a una concentración de 10 mM inhibió el 50% de su actividad y esta inhibición fue parcialmente reversible por la adición de EDTA a una concentración final de 0.1 mM. Posteriormente este mismo autor (15) estudió los efectos de algunos reactivos tiol sobre la GDH dependiente de NAD^+ de extractos libres de células de hojas de Agave americana, y observó que el 5,5'-ditiolbis(2-nitrobenzoato) a una concentración 1.0 mM suprime completamente la actividad de la enzima y a una concentración 0.1 mM la inhibió el 50% y que la inhibición de la actividad de la GDH- NAD^+ por este reactivo tiol se recupera por la adición de: cisteína 2 mM, glutatión reducido 1 mM ó β mercaptoetanol 10 mM.

III MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de maíz raza Tuxpeño-1 fueron donadas por el CIMMYT. Las semillas, previamente lavadas, se sembraron en charolas con agrolita, se regaron diariamente con agua con un fotoperíodo de 12 horas, a los 10 días de edad, las hojas y las raíces se cosecharon y se congelaron a -70°C .

Para la obtención de anticuerpos contra la GDH de raíz de maíz se utilizaron tres conejos machos, raza Nueva Zelanda, con un peso promedio de 2.5 Kg.

EQUIPO

Potenciómetro, Beckman 3550.

Placas de calentamiento y agitación.

Centrífuga, Beckman J2-21.

Centrífuga, MSE.

Espectrofotómetro, Pye Unicam SP-1800 con control de temperatura, programador de tiempo y graficador.

Colector, LKB 700 Ultrorac con agitador LKB 6520.

Concentrador, Amicon pressure cell (XM-20 membrane under 300 KPa/m^2 N_2 pressure).

Equipo multipor LKB 2117.

Fuente de poder, ISCO.

Espectrofotómetro, Carl Zeiss M4 Q111.

Licuadaora, Osterizer.

Baño de temperatura constante, Colora.

Balanza analítica, Mettler.

REACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron todos de grado reactivo de las casas: Técnicas Químicas, J. T. Baker, Merck, Sigma, Pharmacia y Whatman.

PREPARACION DE LAS COLUMNAS

DEAE-SEPHADEX-50

El gel se hinchó con agua desionizada a 0-4°C por 24 horas, se le decantaron los finos, Se equilibró con el buffer de corrida y se montó la columna (30 X 2.5 cm).

SEPHAROSA AZUL

El gel se hinchó con agua desionizada a 0-4°C por 6 horas, se lavó en un filtro de vidrio de placa porosa para eliminar el preservativo del gel. Se montó la columna (24 X 1.5 cm) y se equilibró con el buffer de corrida.

SEPHADEX G-200

El gel se hinchó con agua desionizada a 0-4°C por 48 horas, se le decantaron los finos y se montó la columna (94 X 2.5 cm) evitando que le quedasen burbujas. Una vez montada se equilibró con el buffer de corrida y se calibró con proteínas de peso molecular conocido (figura III.1), para utilizarse en la determinación del peso molecular de la GDH de acuerdo a Andrews (47).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NADH

La actividad de la GDH-NADH se determinó por el método de Joy (11) con ciertas modificaciones (46). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.4 ml	pH 8.2
aKG	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
NH ₄ Cl	100 mM	0.5 ml	
NADH	160 μ M	0.2 ml	
Extracto		<u>0.4 ml</u>	
		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NADH, se incubó a 30°C por 2 minutos y después se inició la reacción añadiendo el NADH. Se graficó la disminución de la absorbancia a 340 nm, se usó sólo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el tris-HCl. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NADH transformados por minuto, para lo cual se usó la gráfica de calibración de la figura (III.2).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD⁺

Para la determinación de la actividad de la GDH-NAD⁺ se siguió el método de Loyola V., V. M. (12). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.9 ml	pH 9.4
Glu	100 mM	0.5 ml	
NAD ⁺	600 mM	0.2 ml	pH 8.0
Extracto		<u>0.4 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD⁺, se incubó a 30°C por 2 minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD⁺. Se graficó el incremento de la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris-HCl. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD⁺ transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura (III.2).

PURIFICACION DE LA GDH DE RAIZ DE MAIZ

- 1) Las raíces se congelaron a -70°C por 3 ó más horas.
- 2) El tejido congelado se molió en un mortero hasta convertirlo en un polvo muy fino, el cual se dejó descongelar.

- 3) Una vez descongelado el tejido pulverizado, se le adicionó el buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM, pH 8.2) en una relación 1:2.5 peso en volumen y 5% (p/p) de polivinilpirrolidona.
- 4) La mezcla se homogenizó por 2 minutos en una licuadora.
- 5) El extracto obtenido en el paso anterior se pasó por dos capas de miracloth.
- 6) El filtrado se centrifugó a 14,000 xg durante 30 minutos en el rotor JA-20 en la centrífuga J2-21.
- 7) El extracto crudo del paso anterior se calentó en baño maría a 60°C por 10 minutos en fracciones de 100 ml y a continuación se enfrió a 0-4°C.
- 8) El extracto se centrifugó a 14,000 xg durante 30 minutos en el rotor JA-20 en la centrífuga J2-21.
- 9) El sobrenadante se puso en contacto con 3/4 de la resina contenida en una columna de DEAE Sephadex; después, a través de un filtro poroso se filtró y se lavó con el buffer de extracción adicionado con KCl 0.05 M.
- 10) Se montó 1/4 de la columna sin enzima y a continuación se montó el resto de la columna con el gel que contenía la enzima.
- 11) Se eluyó la enzima por incremento de la fuerza iónica, aplicando gradientes de 500 ml c/u, desde 0.05-0.1 M, 0.1-0.15 M, 0.15-0.2 M, 0.2-0.25 M hasta 0.25-0.3 M de KCl disuelto en el mismo buffer de extracción.
- 12) El primer pico que eluyó de la columna de DEAE Sephadex fue el que se siguió purificando. Se concentró por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% de saturación.
- 13) El precipitado anterior se redisolvió en el buffer de extracción, se dializó contra el buffer de extracción todo el fin de semana, con cambios de buffer cada 24 horas.
- 14) El dializado se aplicó a una columna de afinidad (Blue-2-Sephadex CL-6B), se lavó la columna con el buffer de extracción y luego se aplicó NAD^+ 1 mM disuelto en el mismo buffer de extracción.
- 15) El pico que eluyó con el buffer se concentró y dializó como lo indican los pasos del 12-13.

16) Se hicieron varias purificaciones y cuando se contó con aproximadamente 1.0 mg de proteína se liofilizó.

* Todos los pasos de purificación se realizaron entre 0-4°C.

PURIFICACION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

- 1) Las hojas se congelaron a -70°C por 3 ó más horas.
- 2) El tejido congelado se molió en un mortero hasta convertirlo en un polvo fino, el cual se dejó descongelar.
- 3) Para eliminar las interferencias debidas a fenoles, ácidos grasos y demás componentes presentes en las hojas, se obtuvieron polvos de cetonas según el método de Garcia-Peregrin, E. et al. (48) con ciertas modificaciones:
Una vez descongelado el tejido pulverizado se le adicionó acetona (acetona a -40°C, mercaptoetanol 14 mM) en una relación 1:10 peso en volumen.
- 4) La mezcla se homogenizó por 1 minuto en una licuadora a alta velocidad.
- 5) El homogenizado anterior se filtró a través de dos capas de miracloth.
- 6) Se repitieron los pasos 3-5, con excepción de que se licuó a velocidad media, hasta que el licuado fue lo más transparente posible.
- 7) El precipitado anterior se lavó con acetona (acetona a -40°C, mercaptoetanol 14 mM) hasta que el filtrado fue totalmente transparente.
- 8) Se dispersó el polvo sobre un papel y se dejó secar por varias horas a temperatura ambiente.
- 9) Los polvos de cetona se congelaron a -70°C por 3 ó más horas.
- 10) Los polvos de cetonas congelados se molieron en un mortero hasta convertirlos en polvos muy finos, los cuales se dejaron descongelar.
- 11) Una vez descongelado el tejido pulverizado, se le adicionó el buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂·2H₂O 1 mM, mercaptoetanol 5 mM, pH 8.2) en una relación 1:2.5 (p/v), 5% (p/p)

de polivinilpirrolidona y se le adicionó inhibidor de proteasas.

- 12) La mezcla se homogenizó por 2 minutos a velocidad máxima en la licuadora.
- 13) El extracto obtenido en el paso anterior se pasó por dos capas de miraclot.
- 14) El filtrado se centrifugó a 14,000 xg durante 30 minutos en el rotor JA-20 en la centrífuga J2-21.
- 15) El extracto anterior se concentró usando el equipo Amicon pressure cell (XM-20 membrane under 300 kPa/m² N₂ pressure).
- 16) El concentrado se aplicó a una columna de DEAE-Sephadex previamente equilibrada con el buffer de extracción, y se eluyó la enzima por incremento de la fuerza iónica, aplicando gradientes de 500 ml c/u de KCl desde 0.05 hasta 0.3 M de KCl.
- 17) El primer pico (el de mayor actividad) se concentró, lavó y se concentró de nuevo, con el equipo Amicon.
- 18) Una vez concentrado el primer pico, se aplicó a una columna de afinidad (Blue-2-Sephadex CL-6B) de 24 X 1.5 cm, se lavó la columna con el buffer de extracción y luego se aplicó NAD⁺ 1 mM disuelto en el mismo buffer de extracción.
- 19) El pico eluido con el buffer de extracción adicionado de NAD⁺ 1 mM, se concentró, lavó y se concentró usando el equipo Amicon.
- 20) El pico anteriormente concentrado se aplicó en una columna de Sephadex G-200 y se eluyó la enzima con el buffer de extracción.
- 21) El pico de enzima del paso anterior se concentró usando el equipo Amicon, la enzima se congeló a -70°C, para posteriores estudios de caracterización.

* Todos los pasos de purificación se realizaron entre 0-4°C.

** En los pasos 14-21 se determinó proteínas y actividades de la GDH.

DETERMINACION DE LAS PROTEINAS

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó el método de Peterson (49), utilizando ASB para la gráfica de calibración, Figura III.6.

CARACTERIZACION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

DETERMINACION DEL pH OPTIMO PARA LAS REACCIONES GDH-NADH Y GDH-NAD⁺

Se determinó la actividad de la GDH-NADH y GDH-NAD⁺ como se describió anteriormente, con excepción de que el pH del buffer Tris-HCl se ajustó a diferentes pHs entre 7.0 y 10.0, y se graficó la velocidad de la GDH contra el pH.

CURVA DE ARRHENIUS

La determinación de la actividad de la GDH-NADH y GDH-NAD⁺ se realizó como se dijo anteriormente, excepto que se fue incubando a diferentes temperaturas y cuando la celda y su contenido llegaban a la temperatura deseada se iniciaba la reacción con la adición de NADH ó NAD⁺, cuando se quería medir la actividad de la GDH a temperaturas mayores de 50°C, para evitar desnaturalización previa de la enzima se adicionó la enzima hasta que los demás componentes y la celda llegaban a la temperatura deseada, se graficó el log de la velocidad de la GDH contra 1/T °K.

EFFECTO DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ FRENTE A DIFERENTES IONES DIVALENTES

Los iones ensallados fueron: Ca²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, y Zn²⁺, se siguió el mismo procedimiento descrito para la medición de la actividad de la GDH-NADH y de la GDH-NAD⁺ con excepción de que el buffer Tris-HCl contenía por separado cada uno de los iones a tal concentración que en el volumen total (3 ml) diera una concentración de 1 y 10 mM de cada uno de los iones.

EFFECTO DEL EDTA EN LA ACTIVIDAD DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

El efecto del EDTA en la actividad de la GDH se determinó en las dos direcciones como se describió anteriormente, el EDTA se ensayó a dos concentraciones 1 y 4 mM, el buffer Tris-HCl lo contenía a manera de dar esa concentración en el volumen final (3 ml).

EFFECTO DEL Ca^{2+} EN LA ACTIVIDAD DE LA GDH INHIBIDA POR EDTA

Después de inhibida la actividad de la GDH-NADH por EDTA 1 mM, se adicionó en la misma celda Ca^{2+} a manera de dar una concentración final 1 mM, se agitó la celda y se determinó nuevamente la actividad de la GDH-NADH.

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA GDH DE RAIZ DE MAIZ

Para la obtención de anticuerpos contra la GDH de raíz de maíz se utilizaron tres conejos machos, raza Nueva Zelanda, con un peso promedio de 2.5 Kg; un conejo se inoculó con GDH de bovino, un segundo conejo con albúmina sérica bovina (ASB) y un tercero con GDH de raíz de maíz, los dos primeros sirvieron como controles del esquema de inmunización para la obtención de los anticuerpos.

A los tres conejos se les inoculó en total alrededor de 1.0 mg de proteína, adicionado de adyubante completo de Fround en una proporción 1:3. El esquema de inmunización consistió en dos inoculaciones con una diferencia de 15 días; a los 10 días de la segunda inoculación se sangraron los conejos y se hizo una prueba de precipitación por capilaridad. A los 13 días de la segunda inoculación se realizó una sangría total en los tres conejos.

ANTIGENICIDAD DE LA GDH DE RAIZ DE MAIZ FRENTE A LA GDH DE HOJAS DE MAIZ, GDH DE BOVINO Y ALBUMINA SERICA BOVINA.

Se usó la técnica de Laurell inmunolectroforesis en cohete, este es un método cuantitativo por medio del cual se puede determinar la concentración de una proteína en una muestra, el método es rápido y reproducible.

PROCEDIMIENTO:

12 ml de agarosa al 1.2% se calentaron en baño maría a 90°C hasta completa fusión, se enfrió hasta 55°C , se adicionó un volumen adecuado del suero correspondiente a manera de obtener el precipitado en forma de cohete de buen tamaño y lo más claro posible: este vo-

lumen fue: para el suero contra ASB de 0.5 ml, para el suero contra GDH de bovino de 0.2 ml y para el suero contra GDH de raíz de maíz de 2.0 ml; se agitó y se aplicó a una placa de 8.5 X 9.5 cm previamente nivelada, se enfrió en el refrigerador por 10 minutos, a lo largo de una orilla del gel se perforaron 8 pozos de 2.5 mm de diámetro y con capacidad para 5 μ l, la muestra proteica se introdujó dentro de los pozos, los primeros 5 pozos contenían al antígeno correspondiente al anticuerpo del gel en diferentes concentraciones, las cuales fueron para la placa de ASB de: 0.099, 0.1315, 0.1960, 0.3846 y 0.9090 mg/ml; para la placa de GDH de bovino fue de: 0.9090, 1.666, 4.0, 5.0 y 10.0 mg/ml y para la de GDH de raíz de maíz fue de: 0.000418, 0.00418, 0.00836, 0.06966 y 0.209 mg/ml. Las graficas de calibración para estos tres sueros se muestra en las figuras III.3, III.4 y III.5; los otros tres pozos contenían los problemas a una concentración media de los antígenos esto es para la placa de ASB fue de 0.196 mg/ml, para la de GDH de bovino fue de 4.0 mg/ml y para la de GDH de raíz de maíz fue de 0.000836 mg/ml, se corrieron las placas por electróforesis a 10 voltios por cm por 3 horas, se formo un precipitado en forma de cohete y la cuantificación del antígeno se basó en la medición del tamaño o área del precipitado.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

Se purificó la GDH tanto de raíz como de hoja de maíz siguiendo los procedimientos indicados en métodos.

El objetivo de la purificación de la GDH de raíz de maíz, fue el de obtener anticuerpos contra la GDH de raíz y compararla inmunológicamente con la GDH de hojas de maíz.

El objetivo de la purificación de la GDH de hojas fue el de obtener datos acerca de su caracterización y comparar estos datos con los obtenidos por Loyola V., V. M. (12) en GDH de raíz de maíz.

En la tabla IV.1 y IV.2 se muestran los resultados obtenidos en la purificación de la GDH de hojas de maíz, tanto en rendimiento como en veces de purificación usando NADH y NAD^+ respectivamente.

En la tabla IV.3 se muestran las actividades específicas de los extractos crudos de la GDH de raíz y hojas de maíz, usando tanto NADH como NAD^+ .

Cuando se compararon las actividades específicas en los extractos crudos de la GDH de raíz con los de GDH de hojas, la actividad específica de la GDH-NADH fue 6.82 veces mayor en raíz que en hoja y la actividad específica de la GDH- NAD^+ fue 27.36 veces mayor en raíz que en hoja, esto sugiere que hay una mayor actividad metabólica para los compuestos nitrogenados por esta vía en raíz que en hojas. Quetz (45) encontró que la actividad de la GDH-NADH era de 4 a 7 veces mayor en raíz que en hojas de maíz.

Por otro lado la relación entre las actividades GDH-NADH/GDH- NAD^+

en raíz fue de 6.19 y en hoja fue de 19.2, lo que sugiere que la GDH de hojas de maíz esta más involucrada en procesos anabólicos en comparación con la GDH de raíz de maíz, según comparaciones realizadas con las actividades específicas de los extractos crudos en ambos tejidos.

PURIFICACION DE LA GDH DE RAIZ DE MAIZ

Cuando el extracto crudo de la GDH de raíz se pasó a través de la columna de DEAE-Sephadex se obtuvieron 3 diferentes picos con actividad como se puede observar en la gráfica de la figura IV.1, estos picos eluyeron a 0.15, 0.19 y 0.23 M de KCl. Posteriormente el pico D-1 que fue el más abundante, se pasó a través de la columna de Sepharosa azul, y se obtuvieron 2 fracciones: una que pasó y otra que se retuvo en la columna, siendo mayor la fracción que pasó a través de la columna, esta fracción denominada D-1A1, fue obtenida de varias purificaciones hasta reunir aproximadamente 1.0 mg de proteína. La fracción D-1A1 se liofilizó y se aplicó a un conejo para la obtención de anticuerpos, como se explicó en métodos. Estos datos de purificación fueron similares a los obtenidos por Loyola V., V. M. (12); y no concuerdan con los encontrados por Yakovleva y Kretovich (28) quienes purificaron parcialmente a la GDH de raíz de maíz y reportaron que obtuvieron 2 isoenzimas por el fraccionamiento que efectuaron en una columna de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sin considerar que cada uno de sus picos se fraccionó nuevamente en una columna de DEAE dando un total de 5 picos; Nicklisch (44) determinó 7 isoenzimas para la GDH de raíz de maíz.

PURIFICACION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

El extracto crudo de la GDH de hojas de maíz se fraccionó en una columna de DEAE-Sephadex obteniendose 7 diferentes picos con actividad (D-1, D-2, D-3, D-4, D-5, D-6 y D-7) (figura IV.2) que eluyeron entre 0.1 y 0.3 M de KCl. Cada uno de ellos mostró actividad tanto con NADH como con NAD^+ . Este fraccionamiento de la GDH de hojas es diferente al encontrado en la GDH de raíz, observandose desde aquí diferencias significativas en cuanto al patron de isoenzimas.

Un 45% de actividad se determinó en el primer pico (D-1), medida con NADH. Este pico se purificó nuevamente en una columna de Sepharosa Azul, obteniéndose una sólo fracción que se retuvo en la columna y que eluyó con NAD^+ 1 mM, sugiriendo con esto que es una isoenzima con afinidad por NAD^+ , este pico se designó como D-1A2, figura IV.3. Esta afinidad por el cofactor es diferente a la GDH de raíz, ya que en esta la mayor parte de la enzima pasó por la columna y una minoría (el 15%) se retuvo.

Finalmente el pico D-1A2 se filtró a través de la columna de Sephadex G-200 por la que previamente se habían pasado proteínas de calibración, como muestra la gráfica de calibración de la figura III.1. Obteniéndose un peso molecular de aproximadamente 260,000 daltones. La gráfica de elusión del pico D-1A2G se muestra en la figura IV.4. Con esta fracción se realizaron los estudios de caracterización de la GDH de hojas de maíz. Loyola V., V. M. (12) por esta misma técnica de cromatografía de filtración en gel, determinó un peso molecular de aproximadamente 270,000 daltones para la GDH de raíz de maíz.

En las tablas IV.1 y IV.2 se muestran los resultados obtenidos en la purificación de la GDH de hojas de maíz, tanto en rendimiento como en veces de purificación, usando NADH y NAD^+ respectivamente. La fracción D-1A2G de la GDH de hojas de maíz se purificó 341 veces, en comparación con el trabajo de Bulen (14) quien la purificó 56 veces y sólo separó una isoenzima.

ESTUDIOS DE CARACTERIZACION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GDH

Se ensayó el efecto de la temperatura en las actividades GDH-NADH (figura IV.5) y GDH- NAD^+ (figura IV.6). Las gráficas de Arrhenius muestran claramente diferencias significativas en su dependencia respecto a la temperatura, ya que la reacción GDH-NADH muestra dos puntos de quiebre uno a 25 y otro a 47°C y la reacción GDH- NAD^+

muestra sólo uno a los 48°C, en cuanto a las energías de activación para la reacción aminativa se obtuvieron de 10 a 25°C una energía de activación de 26.1 kilocalorías/mol, para la de 26 a 47°C fue de 7.2 kilocalorías/mol y para la reacción desaminativa la energía de activación de la reacción entre 10 y 48°C fue de 10.7 kilocalorías/mol y la de 49 a 76°C fue de 2.4 kilocalorías/mol. Loyola V., V. M. (12) determinó el efecto de la temperatura en la GDH de raíz de maíz, encontrando que la reacción aminativa muestra dos puntos de quiebre uno a 39 y el otro a 56°C mientras que la desaminativa muestra sólo uno a 46°C.

Por lo que respecta al pH óptimo para medir la reacción in vitro se encontró que la actividad de la GDH-NADH muestra un pH óptimo de 8.2 (figura IV.7), en tanto que para la reacción GDH-NAD⁺ el pH óptimo fue de 9.0 (figura IV.8). Estos valores son similares a los encontrados por Loyola V., V. M. (12) en raíz de maíz, por King y Yung-fan (22) en cotiledones de soya, en alfalfa (24), en remolacha (23), hojas de maíz (14). Sin embargo estos valores de pH varían en otras plantas como chícharo: Yamasaki y Suzuki (21) determinaron un pH óptimo de 7.5 para la reacción aminativa y de 10.0 para la desaminativa en plántulas de chícharo, Pahlich y Joy (2) determinaron un pH óptimo de 8.0 para ambos sentidos de la GDH de raíz de chícharo.

EFFECTO DE DIFERENTES IONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ

Se determinó el efecto de Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ y Co²⁺ en la actividad de la GDH-NADH y GDH-NAD⁺, las concentraciones ensayadas de los diferentes iones fueron 1 y 10 mM. Cada ión se incubó por 10 minutos a 30°C con la enzima. Se obtuvieron los datos que se muestran en el histograma de la figura IV.9, el ión que tuvo un mayor efecto activador sobre la GDH fue el Ca²⁺ que a una concentración 1 mM tuvo una actividad aminativa de 103% y una actividad desaminativa de 181.98%, luego siguió el Mg²⁺ que a una concentración 1 mM se observó una actividad aminativa de 105.83% y una actividad desa-

minativa de 114.0%. El Ni^{2+} 1 mM inhibió la reacción aminativa en un 43%, en tanto que la desaminativa tuvo una actividad de 111.7%. El Zn^{2+} también inhibió la reacción aminativa en un 65.3% y la actividad desaminativa tuvo una actividad de 112%. El Co^{2+} 1 mM inhibió la actividad aminativa en un 13% e inhibió completamente la actividad desaminativa. Garland y Dennis (9) encontraron un máximo de actividad de la GDH extraída de tallo de plántulas de chícharo con Ca^{2+} 1.0 mM, Zn^{2+} 0.2 mM; Joy (16) encontró que el Zn^{2+} juega un papel importante en la regulación de la actividad de la GDH ya que a bajas concentraciones causaba un aumento en la actividad de la GDH-NADH y a altas concentraciones la inhibía; por otro lado también la activaban Ca^{2+} y Mn^{2+} , en tanto que Mg^{2+} casi no la alteraba; Ramírez *et al.* (46) encontraron que la GDH extraída de Agave americana los iones divalentes no tienen efecto sobre su actividad, el único que la alteraba era el Zn^{2+} el cual a una concentración 10 mM la inhibía el 50% y Pahlich (16) observó que la GDH extraída de plántulas de chícharo era fuertemente inhibida por Zn^{2+} .

EFFECTO DEL EDTA FRENTE A LA GDH DE HOJAS DE MAIZ in vitro

La fracción D-1A2C fue ensayada a dos concentraciones de EDTA 1 y 4 mM y a dos tiempos de incubación 5 y 10 minutos, los resultados se muestran en el histograma de la figura IV.10 observándose un mayor efecto inhibitorio de la actividad de la GDH-NADH a una concentración de 4 mM de EDTA tanto con 5 como con 10 minutos de incubación siendo la inhibición del 76.2%. A una concentración de 1.0 mM de EDTA y 5 minutos de incubación tan sólo se inhibió 52.5% la actividad, mientras que con 10 minutos de incubación la inhibición fue del 60.3%. El EDTA a estas concentraciones y tiempos de incubación no tuvo efecto sobre la actividad de la GDH-NAD⁺. Pahlich y Joy (2) determinaron que el EDTA 1 mM inhibió la actividad dependiente de NADH en un 70% y la dependiente de NAD⁺ en un 20% de la GDH extraída de raíz de chícharo; Garland y Dennis (9) encontraron que el EDTA 0.025 mM inhibía la reacción aminativa un 57% de la GDH extraída de tallo de plántulas de chícharo; Chou y Splittstoesser (10) purificaron la GDH de cotiledones de calabaza y observaron que la activi-

dad de la GDH-NADH era inhibida por EDTA: que a una concentración 1.0 mM la inhibía un 96%, a 0.1 mM un 94%, a 0.01 mM un 90% y a 0.001 mM la inhibía un 14%; Polikarpochkina (11) reportó que la GDH de hojas de maíz era sensible a los compuestos quelantes: el EDTA 1.0 mM incubado por 10 minutos con la enzima inhibía un 40% la actividad GDH-NADH y 4 mM de EDTA la inhibía un 62%; Loyola V., V. M. (12) observó que el EDTA no afecta de la misma manera las dos actividades de la GDH de raíz de maíz, si bien finalmente obtuvo el 100% de inhibición para ambas actividades con 130 μM de EDTA y 2 minutos de incubación.

EFFECTO DEL Ca^{2+} EN LA ACTIVIDAD DE LA GDH INHIBIDA POR EDTA

Después de que el EDTA 1 mM se incubó por 10 minutos con la enzima libre de Ca^{2+} , se midió la actividad de la GDH-NADH y dió un 67% de inhibición, se adicionó en la misma celda Ca^{2+} a dar una concentración final de 1.0 mM, se recuperó parcialmente la actividad pues sólo quedó inhibida un 20.05% de la actividad de la GDH-NADH como se puede observar en el histograma de la figura IV.11. Chou y Splittstoesser (10) observaron también que la actividad de la GDH inhibida por EDTA se recuperaba por la adición de iones divalentes como Ca^{2+} , Mn^{2+} o por Cu^{2+} ; Loyola V., V. M. (12) observó que la GDH de raíz de maíz después de ser inhibida por EDTA recuperaba la actividad por la adición de iones divalentes y que en un rango de 60 a 70 μM recuperaba la actividad aminativa en un 100%, mientras que Mg^{2+} sólo recuperaba el 40% de la actividad a concentraciones tan elevadas como 1,500 μM ; sin embargo la actividad desaminativa si se recuperaba con Mg^{2+} a bajas concentraciones.

Como se puede observar la GDH de hojas de maíz responde en forma diferente en los sentidos de la reacción que cataliza, desde sus efectos frente a diferentes iones, curvas de Arrhenius, efectos frente al EDTA, hasta pH óptimos; estos datos sugieren que las reacciones de ida y vuelta tienen requerimientos conformacionales diferentes, para la enzima que cataliza.

Shatilov, V and Sund, H. (50) realizaron un estudio de la GDH (E. C. 1. 4. 1. 3.) de Scenedesmus acutus (una alga verde), reportando que el PHMB a concentraciones menores de 5 mM afecta sólo la reacción desaminativa de la GDH y que esta inhibición es significativamente reversible por la adición de ditiotreitól; la GDH es estable en urea 4 mM, pero si se le añaden los substratos ocurre una irreversible inactivación de la enzima en 1-2 minutos. Por lo que concluyeron que la enzima exhibe un equilibrio entre 3 conformaciones. Una conformación (D) que reacciona con PHMB y es inducida por Glu adicionado de NAD^+ , mientras que ΔKG adicionado de NADH induce una conformación (A) no accesible a este reactivo $-\text{SH}$, y en la ausencia de substrato existe una conformación (N) la cual es significativamente diferente de (D) y (A) y es además más estable en la presencia de urea.



Las transiciones conformacionales de la GDH de Scenedesmus acutus explican:

- 1) Que las conformaciones (A) y (D) se pueden obtener de la conformación (N) y viceversa.
- 2) La reacción con PHMB puede ser reversible por ditiotreitól.
- 3) De acuerdo con el mecanismo de reacción, (A) y (D) están en equilibrio.

Este estudio del metabolismo nitrogenado en raíz y hoja de maíz, ayudará a una mayor comprensión de la fisiología y bioquímica de la planta. Estos conocimientos permitirán avanzar en las investigaciones conducidas a la obtención de mutantes, adaptabilidad, fotovegetativos, etc., que optimicen la producción agrícola de este alimento tan importante tanto para el hombre como para los animales.

Pero aún falta mucho por saber, pues además de contar con pocos estudios estos muchas veces se contradicen.

Para tal fin que se pretende alcanzar sería preciso:

- Saber si el número de isoenzimas varía con la edad de la planta y si alguna o varias permanecen constantes durante su crecimiento, para saber cual isoenzima es la más importante y como obtener mutantes en base a esta.
- Si realmente se trata de conformeros o son mezclas de verdaderas isoenzimas.
- Que relaciones tiene con la GDH animal ya que esta última tiene muchos estudios y sería fácil llegar a conclusiones.
- Más variables que la afectan.

ANTIGENICIDAD DE LA GDH DE RAIZ DE MAIZ FRENTE A LA GDH DE HOJAS DE MAIZ, GDH DE BOVINO Y ALBUMINA SERICA BOVINA

Los resultados de los ensayos inmunológicos realizados por la técnica de Laurell son los siguientes:

1) Placa: 12 ml de agarosa + 2 ml de suero contra la GDH de raíz de maíz, tamaño de la placa 8.5 X 9.5 cm, área de la placa 8,075 mm².

Antígeno: Solución stock de 0.418 mg/ml de GDH de raíz de maíz.

Pozo	Concentración del antígeno (mg/ml)	Tamaño del cohete (mm)	Area del cohete (mm ²)
1	0.000418	---	---
2	0.00418	---	---
3	0.00836	---	---
4	0.06966	20	5.0
X 5	0.209	40	10.0
6	GDH de hojas	---	---
7	GDH de bovino	---	---
8	ASB	---	---

El título del suero fue:

X 0.209 mg ----- 1.0 ml (Concentración del antígeno)

X ----- 0.005 ml (Capacidad del pozo)

X = 0.001045 mg

0.001045 mg ----- 10.0 mm²

X ----- 8,075 mm²

X = 0.8438 mg

0.8438 mg ----- 2.0 ml de suero

X ----- 1.0 ml de suero

X = 0.4219 mg de proteína de GDH de raíz de maíz que hay en cada ml de suero contra la GDH de raíz de maíz.

La GDH de raíz de maíz es antigenicamente diferente a la GDH de hojas de maíz, a la GDH de bovino y a la ASB. La gráfica de calibración se muestra en la figura III.5 y la placa se muestra en la gráfica de la figura IV.12.

Estos datos sugieren que la GDH de raíz y la GDH de hojas de maíz tienen diferente origen genético ya que no cruzan inmunológicamente. Pahlich, et al. (36) obtuvieron anticuerpos monoespecíficos contra la principal banda de actividad de la GDH de plántulas de chícharo, para compararla inmunológicamente con las otras bandas y observaron que todas contenían los mismos determinantes antigénicos en cambio, cuando la compararon con la GDH-NADP⁺ de hgado de res y con la GDH-NADP⁺ de Candida utilis (una levadura) no hubo cruce por lo que no mostraron relación serológica, debido probablemente a que los anticuerpos obtenidos eran de GDH específicos para NAD⁺.

2) Placa: 12 ml de agarosa + 0.2 ml de anticuerpos contra la GDH de bovino, tamaño de la placa 8.5 X 9.5 cm, área de la placa 8,075 mm².

Antígeno: solución stock de 10 mg/ml de GDH de bovino.

Pozo	Concentración del antígeno (mg/ml)	Tamaño del cohete (mm)	Área del cohete (mm ²)
1	0.9090	5.0	12.50
2	1.6666	7.0	17.50
X 3	4.0	13.0	32.50
4	5.0	17.0	42.50
5	10.0	30.0	75.00
6	GDH de hoja	---	---
7	GDH de raíz	---	---
8	ASB	---	---

El título del suero fue:

X 4.0 mg ----- 1.0 ml (concentración del antígeno)
 X ----- 0.005 ml (capacidad del pozo)

$X = 0.02 \text{ mg}$
 $0.02 \text{ mg} \text{ ----- } 32.50 \text{ mm}^2$
 $X \text{ ----- } 8,075 \text{ mm}^2$
 $X = 4.969 \text{ mg}$
 $4.969 \text{ mg} \text{ ----- } 0.2 \text{ ml de suero}$
 $X \text{ ----- } 1.0 \text{ ml de suero}$
 $X = 24.84 \text{ mg de GDH de bovino son equivalentes a}$
 $\text{cada ml de suero contra la GDH de bovino.}$

Como muestran los resultados de la placa de la figura IV.13, la GDH de bovino es antigenicamente diferente a la GDH de hojas de maíz, a la GDH de raíz de maíz y a la ASB. En la gráfica de la figura III.4 se muestra la gráfica de calibración de los resultados de esta placa.

3) Placa: 12 ml de agarosa + 0.5 ml de suero contra la ASB, tamaño de la placa 8.5 X 9.5 cm, área 8,075 mm².
 Antígeno: solución stock de 10 mg/ml de ASB.

Pozo	Concentración del antígeno (mg/ml)	Tamaño del cohete (mm)	Área del cohete (mm ²)
1	0.0990	65	162.5
2	0.1315	85	212.5
X 3	0.1960	110	225.0
4	0.3846	190	475.0
5	0.9090	310	775.0
6	GDH de bovino	---	---
7	GDH de raíz	---	---
8	GDH de hoja	---	---

El título del suero fue:

$\$ 0.196 \text{ mg} \text{ ----- } 1.0 \text{ ml (concentración del antígeno)}$
 $X \text{ ----- } 0.005 \text{ ml (capacidad del pozo)}$
 $X = 0.00098 \text{ mg}$

0.00098 mg ----- 225.0 mm²

X ----- 8,075 mm²

X= 0.0351 mg

0.0351 mg ----- 0.5 ml

X ----- 1.0 ml

X= 0.0703 mg de ASB equivalen a cada ml de suero
contra la ASB.

Como muestran los resultados de la figura IV.14 la albúmina sérica bovina es antigenicamente diferente a la GDH de raíz de maíz, a la GDH de hojas de maíz y a la GDH de bovino. La gráfica de calibración se muestra en la figura III.3.

V CONCLUSIONES

- 1) Existen 7 isoenzimas de GDH en hojas y sólo 3 en raíz de maíz, tomando en cuenta su fraccionamiento en una columna de DEAE-Sephadex.
- 2) La GDH aminativa y desaminativa de hojas de maíz, son diferentes formas estructurales ó conformacionales.
- 3) La GDH de hojas se parece a la GDH de raíz de maíz en: el pH óptimo, efecto de los iones, y sus curvas de Arrhenius para ambas actividades.
- 4) La GDH de hojas es diferente a la GDH de raíz de maíz en cuanto a su efecto quelante con el EDTA y sus determinantes antigénicos.
- 5) El peso molecular de la GDH de hojas de maíz fue aproximadamente de 260,000 daltones y el encontrado por Loyola V., V. M. (12) en raíz de maíz fue de 270,000 daltones.

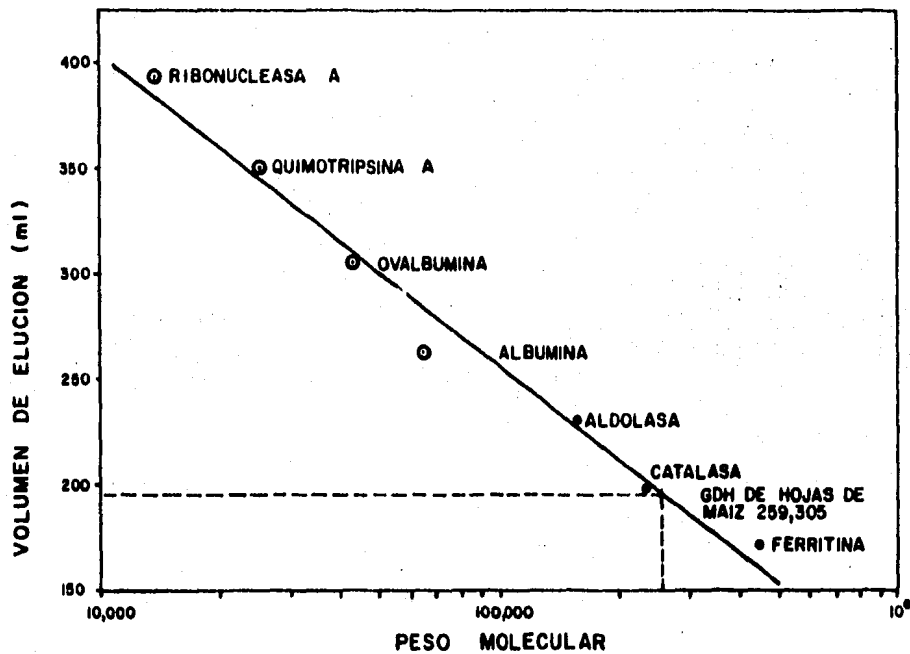


FIGURA 11. CURVA DE CALIBRACION USANDO TANTO MOLECULAS DE BAJO (○) COMO DE ALTO (●) PESO MOLECULAR

A₃₄₀

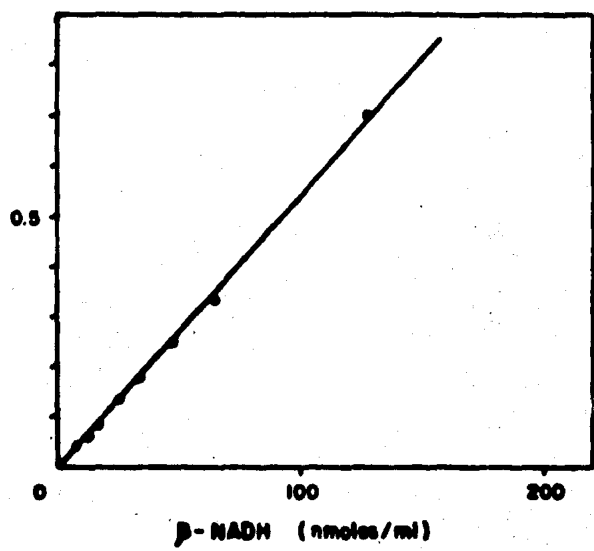


FIGURA III.2 GRAFICA DE CALIBRACION DE
β - NADH

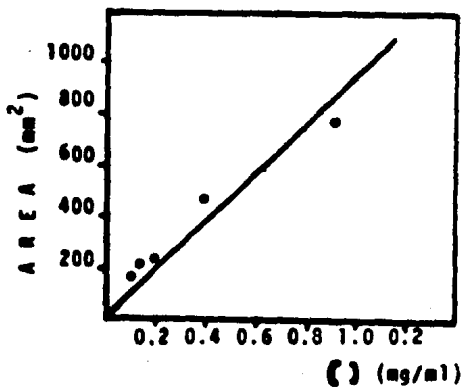


FIGURA III.3 GRAFICA DE CALIBRACION DE LA ASB

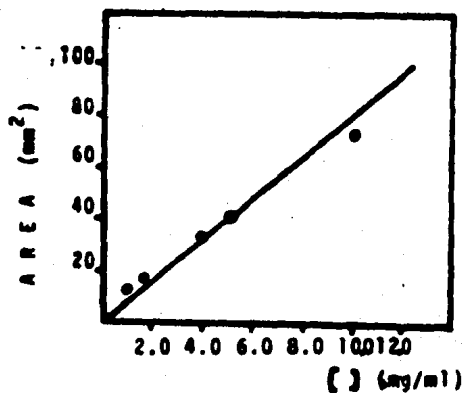


FIGURA III.4 GRAFICA DE CALIBRACION DE LA GDM DE BOVINO

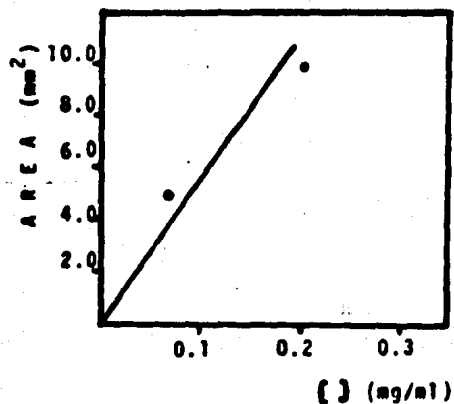
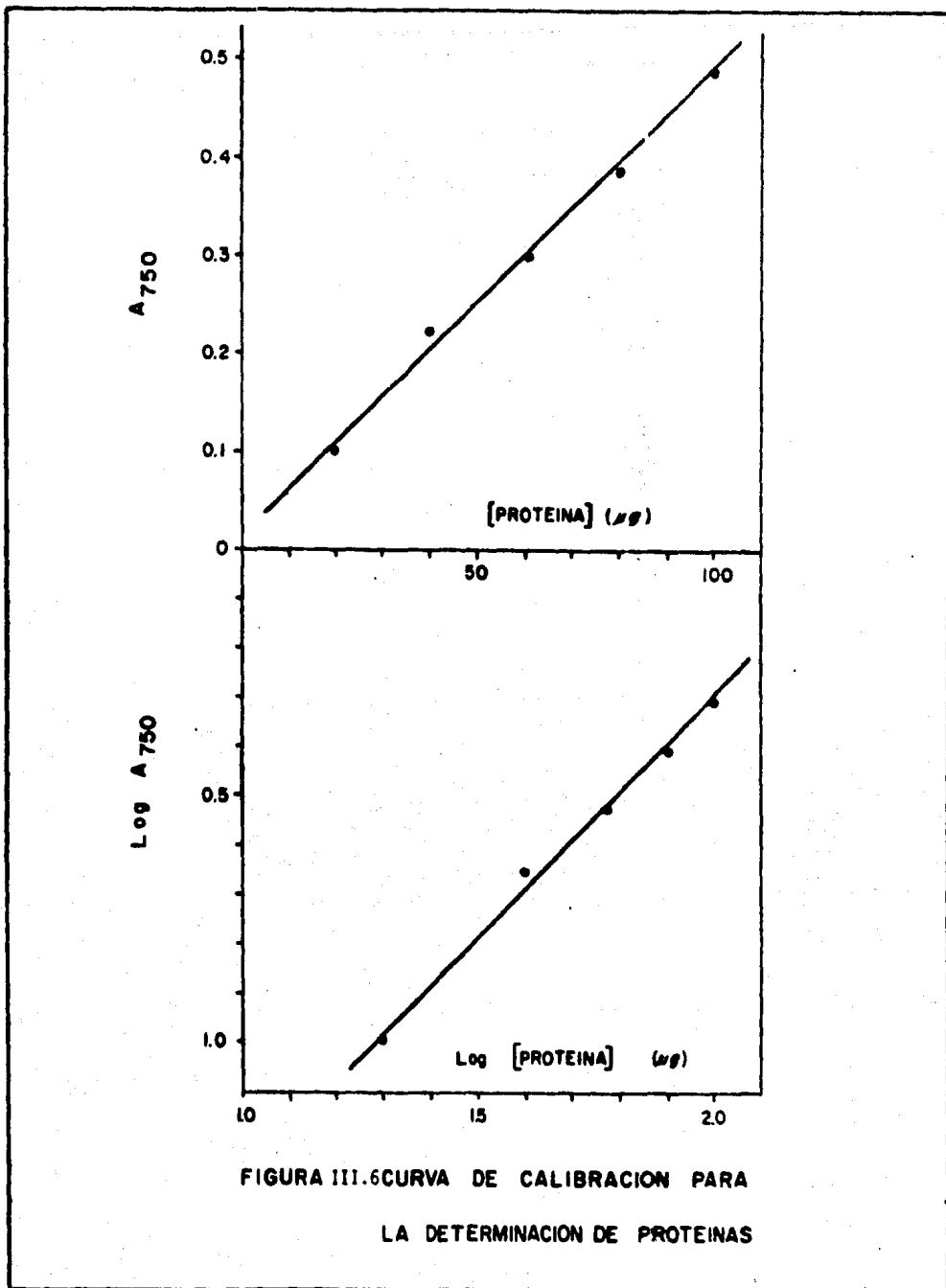


FIGURA III.5 GRAFICA DE CALIBRACION DE LA GDM DE RAIZ DE MAIZ



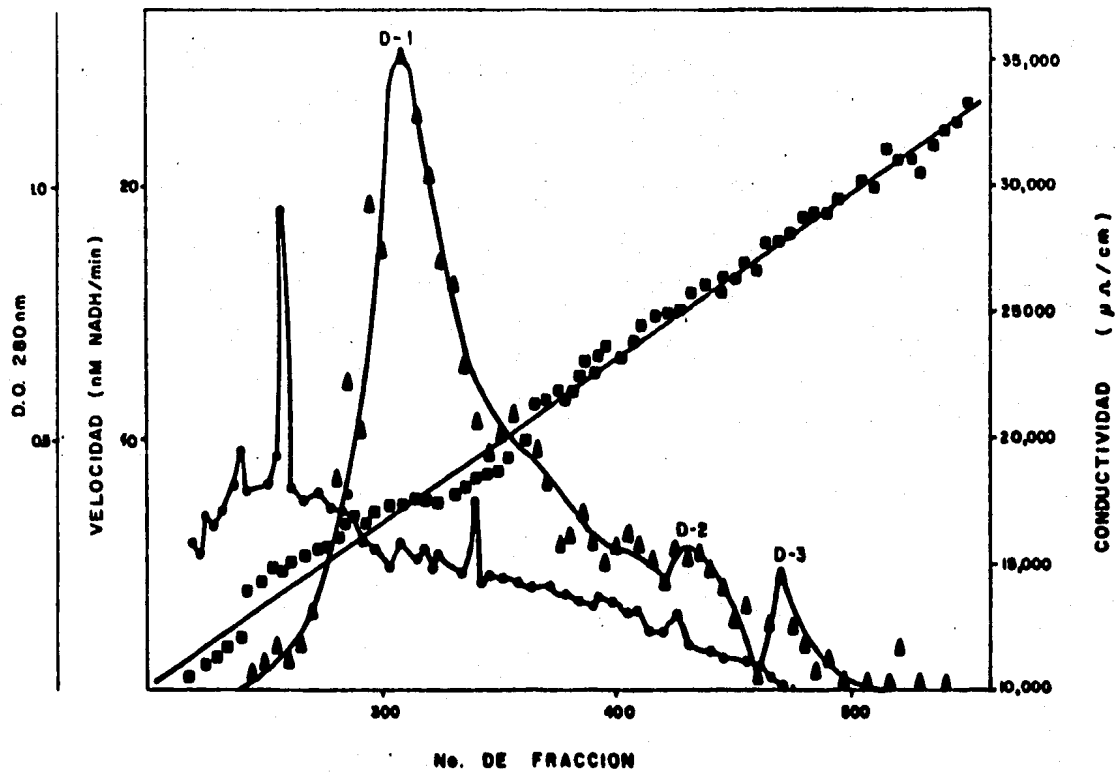
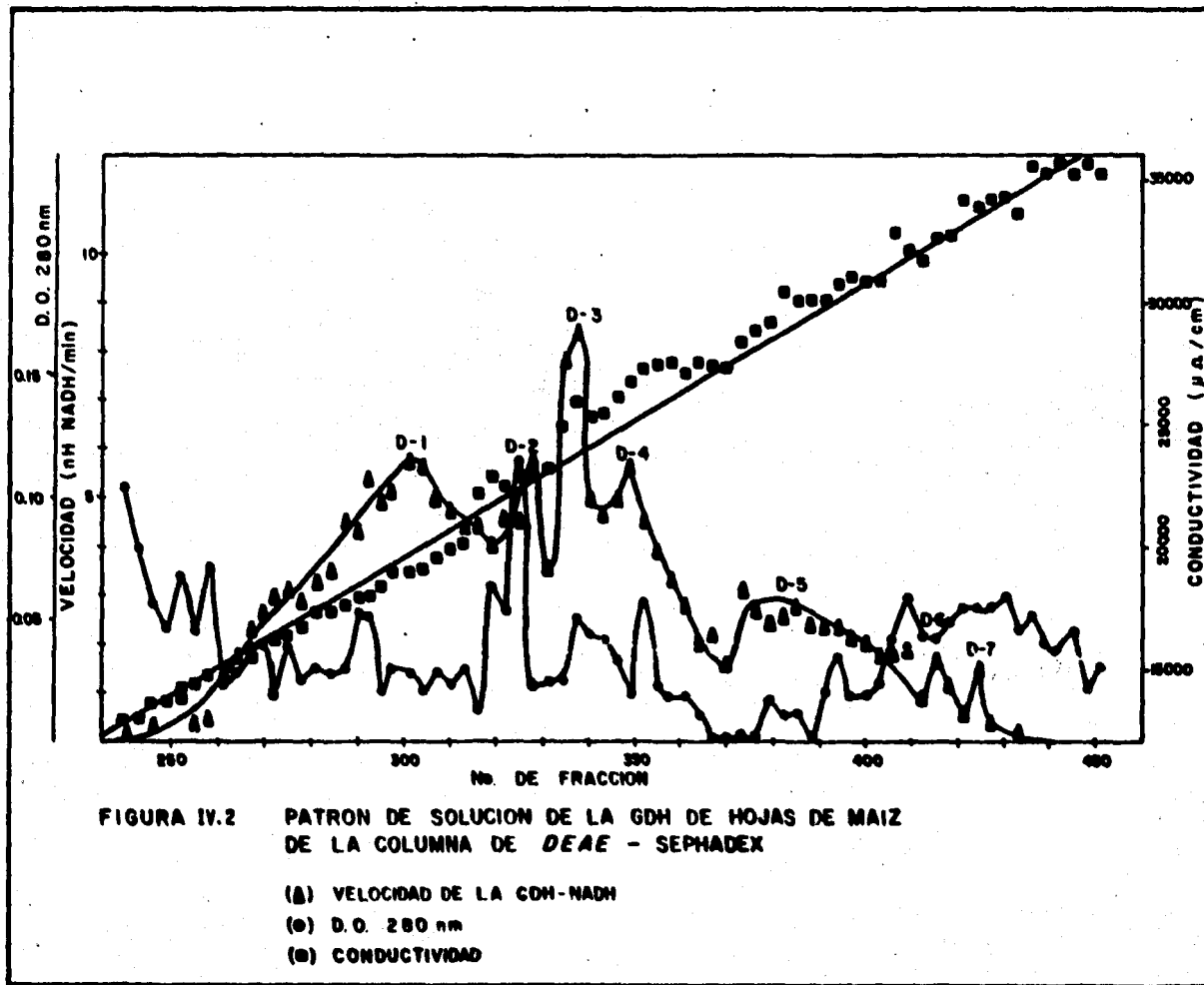


FIGURA IV.1 PATRON DE ELUCION DE LA GDH DE RAIZ DE MAIZ DE LA COLUMNA DEAE-SEPHADEX (Δ) VELOCIDAD DE LA GDH-NADH, (●) D.O. 280 nm Y (■) CONDUCTIVIDAD



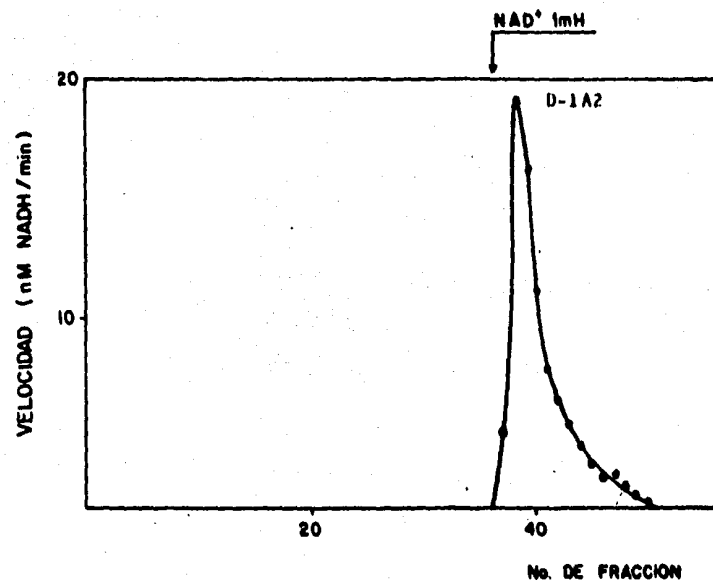


FIGURA IV.3 PATRON DE ELUCION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ DE LA COLUMNA DE SEPHAROSA AZUL

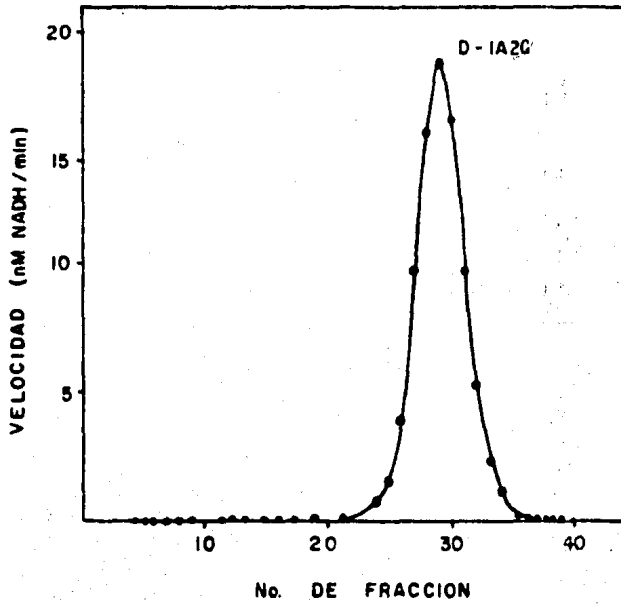


FIGURA IV.4 PATRON DE ELUSION DE LA GDH DE HOJAS DE MAIZ DE LA COLUMNA G-200

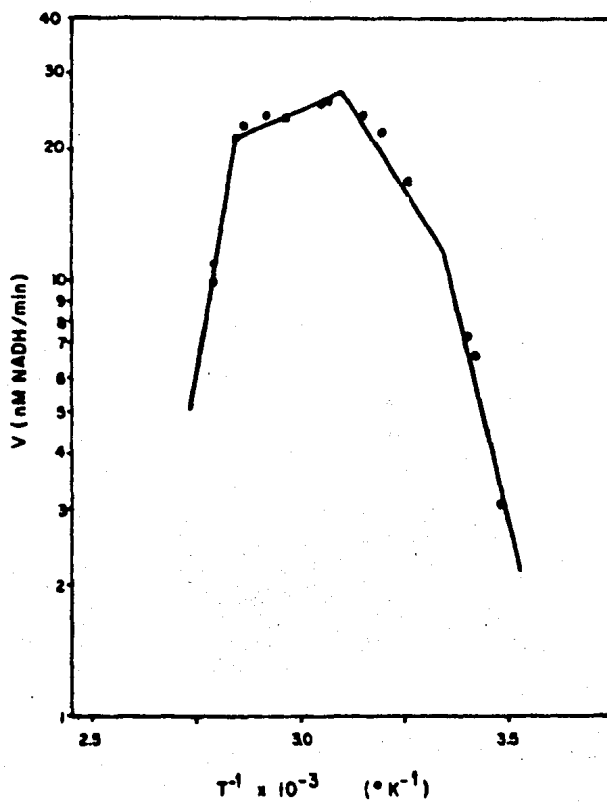


FIGURA IV.5 CURVA DE ARRHENIUS PARA LA
GDH-NADH DE HOJAS DE MAIZ

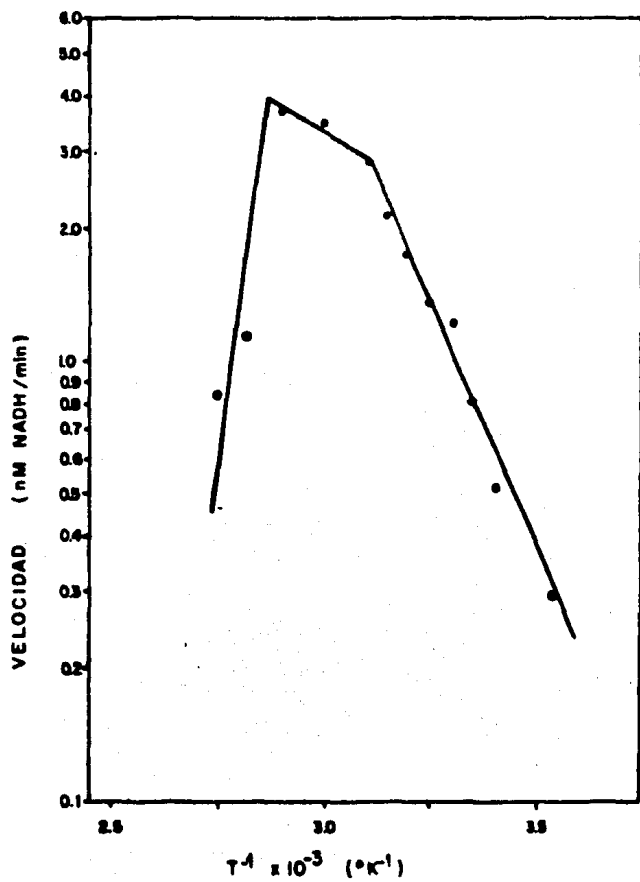


FIGURA IV.6 CURVA DE ARRHENIUS PARA LA
GDH-NAD⁺ DE HOJAS DE MAIZ

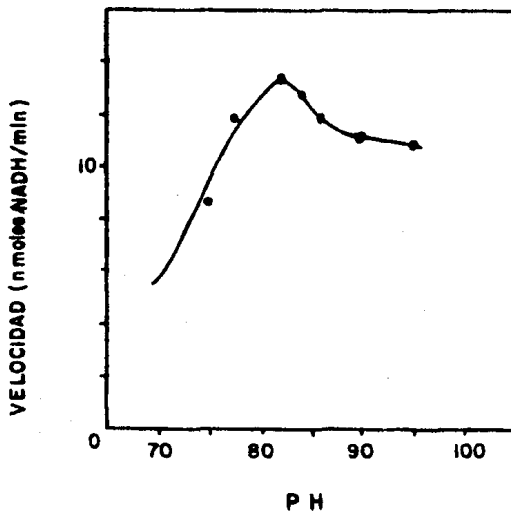


FIGURA IV.7 EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD GDH-NADH DE HOJAS DE MAIZ

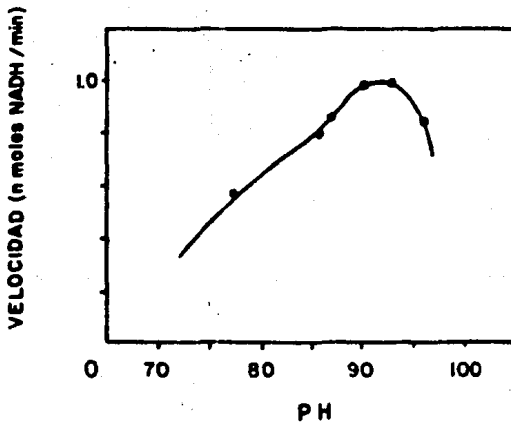


FIGURA IV.8 EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD GDH-NAD⁺ DE HOJAS DE MAIZ

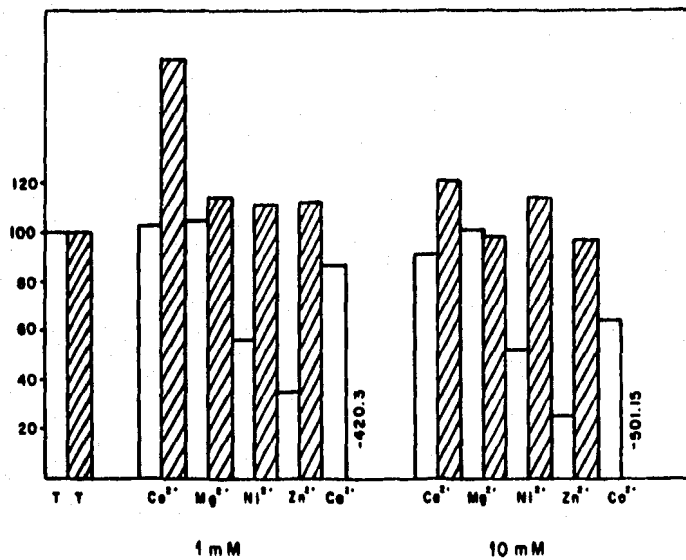


FIGURA IV.9 EFECTO DE DIFERENTES IONES METALICAS
 EN LAS ACTIVIDADES DE LA GDH-NADH □
 Y GDH-NAD⁺ ▨ DE HOJAS DE MAIZ

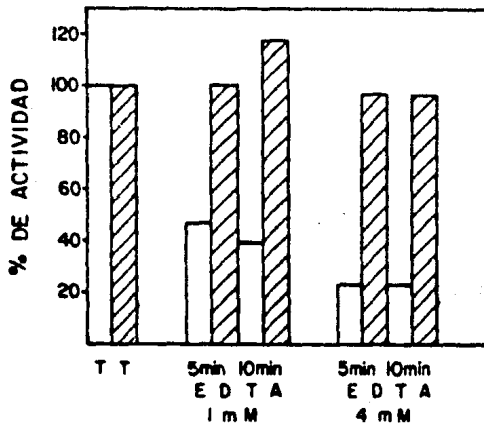


FIGURA IV.10 EFECTO DEL EDTA EN LAS
 ACTIVIDADES DE LA GDH-
 NADH □ Y GDH-NAD⁺ ▨ DE
 HOJAS DE MAIZ

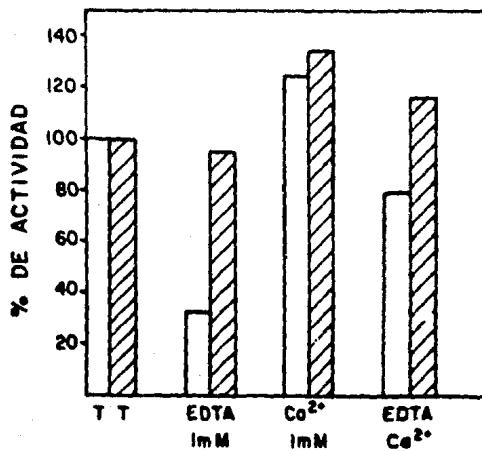


FIGURA IV.11 RECUPERACION PARCIAL DE
 LAS ACTIVIDADES DE LA GDH-
 NADH □ Y GDH-NAD⁺ ▨ DE HO-
 JAS DE MAIZ DESPUES DE IN-
 HIBIRLAS CON EDTA ADICIONAN-
 DOLES CALCIO

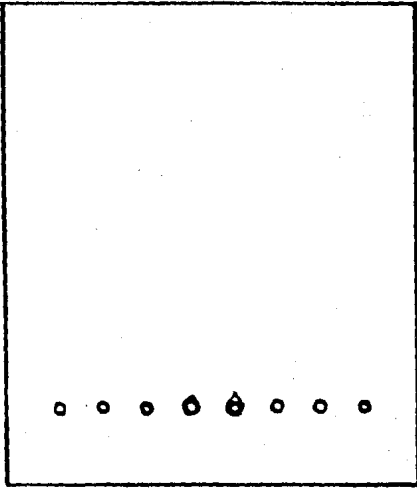


FIGURA IV.12 PLACA QUE CONTENIA LA GDH DE RAIZ DE MAIZ

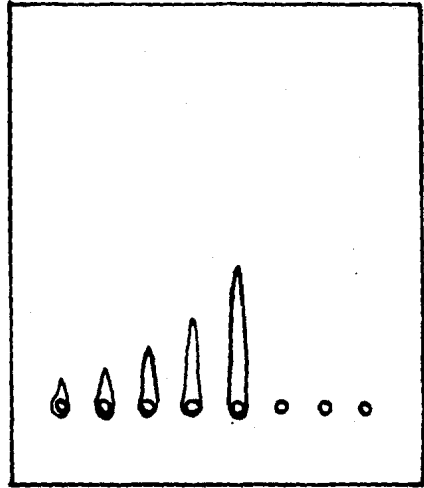


FIGURA IV.13 PLACA QUE CONTENIA LA GDH DE BOVINO

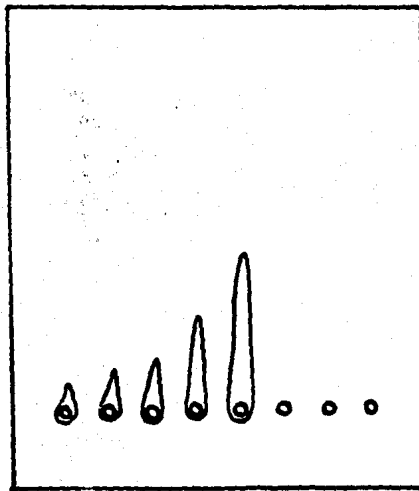


FIGURA IV.14 PLACA QUE CONTENIA LA ASB

Paso de purificación	Volumen (ml)	Actividad $\frac{\mu\text{M NADH}}{\text{min}}/\text{ml}$	Actividad total $\mu\text{M NADH}/\text{min}$	Proteínas $\mu\text{g}/\text{ml}$	Proteínas totales (mg)	Actividad específica $\frac{\mu\text{M NADH}}{\text{min}}/\text{mg}$	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	300.0	51.65	15,495	714.6	214.4	72.3	1.0	100.0
Concentración del extracto	58.0	224.2	13,009	1,064.6	61.74	210.6	2.9	83.95
Concentrado del pico D-1	12.55	400.9	5,031	644.8	8.1	621.7	8.6	32.46
Concentrado del pico D-1A2	14.1	100.9	1,422	6.72	0.01	15,014.8	207.7	9.17
Concentrado del pico D-1A2G	9.5	133.9	1,272	5.43	0.05	24,645.7	341.0	8.2

TABLA IV.1. Purificación de la GDH de hojas de maíz seguida con NADH.

El pico D-1.- Es el primer pico de actividad que eluyó de la columna de DEAE Sephadex.

El pico D-1A2.- Es el pico con actividad que eluyó de la columna de Sepharosa azul.

El pico D-1A2G.- Es el pico con actividad que eluyó de la columna de Sephadex G-200.

Paso de purificación	Volumen (ml)	Actividad nM NADH/min/ml	Actividad total nM NADH/min	Proteínas µg/ml	Proteínas totales (mg)	Actividad específica nM NADH/min/mg	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	300.0	2.69	807.0	714.6	214.4	3.76	1.0	100.0
Concentración del extracto	58.0	8.07	468.3	1,064.6	61.74	43.77	11.62	58.02
Concentrado del pico D-1	12.55	18.3	229.6	644.8	8.1	28.38	7.53	28.45
Concentrado del pico D-1A2	14.1	13.7	193.17	6.72	0.01	2,038.69	541.6	23.93
Concentrado del pico D-1A2C	9.5	10.6	100.42	5.43	0.05	1,946.59	517.15	12.44

TABLA IV.2. Purificación de la GDH de hojas de maíz seguida con NAD⁺.

El pico D-1.- Es el primer pico con actividad que eluyó de la columna de DEAE Sephadex.

El pico D-1A2.- Es el pico con actividad que eluyó de la columna de Sepharosa azul.

El pico D-1A2C.- Es el pico con actividad que eluyó de la columna de Sephadex G-200.

TEJIDO	Actividad específica de la GDH-NADH $\frac{\text{nM NADH}}{\text{min}} / \text{mg}$	Actividad específica de la GDH-NAD ⁺ $\frac{\text{nM NADH}}{\text{min}} / \text{mg}$
RAIZ	637.61	103.00
HOJA	72.27	3.76

TABLA IV.3. Actividad específica de la GDH de raíz y hojas de maíz en los extractos crudos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Loyola V., V. M., Murillo G., E. y Sanchez de J., E., El metabolismo del nitrógeno en las plantas, *Naturaleza*, 2, 112-116, (1981).
- 2) Pahlich, E. and Joy, K. W., Glutamate dehydrogenase from pea roots: purification and properties of the enzymes, *Can. J. Biochem.*, 49, 127-138, (1971).
- 3) Fawole, M. O. and Boulter, D., Purification and properties of glutamate dehydrogenase from *Vigna unguiculata* (L.) walp., *Planta*, 134, 97-102, (1977).
- 4) Stone, S. R., Copeland, L. and Kennedy, I. R., Glutamate dehydrogenase of lupin nodules: purification and properties, *Phytochemistry*, 18, 1273-1278, (1979).
- 5) Leech, Rachel H. and Kirk, Paul R., An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of *Vicia faba* L., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 32, 685-690, (1969).
- 6) Gayler, K. R. and Morgan, W. R., An NADP-dependent glutamate dehydrogenase in chloroplasts from the marine green alga *Caulerpa simpliciuscula*, *Plant. Physiol.*, 58, 283-287, (1976).
- 7) Washitani, I. and Soto, S., Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro cultured tobacco cells. I. Localization of nitrite reductase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase, *Plant. cell. Physiol.*, 18, 117-125, (1977).

- 8) Postius, Ch. 1975. Dissertation, University of Göttinger.
- 9) Garland, J. W. and Dannis, T. D., Steady-state kinetics of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum L. mitochondria, Archives of biochemistry and biophysics, 152, 614-625, (1977).
- 10) Chou, Kuo-Howere and Splittstoesser, Walter E., Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons, Plant. Physiol., 49, 550-554, (1972).
- 11) Polikarpochkina, R. T., Presence of Zinc in glutamate dehydrogenase of corn roots, Soviet. Plant. Physiol., 22, (5), 850-853, (1975).
- 12) Loyola V., V. M., Metabolismo nitrogenado en maíz. Tesis. Doctorado. Div. Est. Pg., Facultad de Química. UNAM, (1983).
- 13) Welander, Margareta, The effect of mercaptoethanol on the activity of nitrogen metabolism in leaves from Urtica dioica and Spinacea oleracea, Physiol. Plant., 43, 242-246, (1975).
- 14) Bulen, William A., The localization and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves, Archives of Biochemistry and Biophysics, 62, 173-183. (1956).
- 15) Ramirez, H. and Garcia-Peregrin, E., Differential effect of thiol binding reagents on the glutamate dehydrogenase activity from Agave americana L., Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 87 (1), 85-89, (1978).
- 16) Joy, Kenneth W., Control of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum roots, Phytochemistry, 12, 1031-1040, (1973).
- 17) Moore, A. L. and Akerman, K. E. O., Ca²⁺ stimulation of the external NADH dehydrogenase in Jerusalem artichoke (Helian-

- thus tuberosum) mitochondria, Biochemical and Biophysical research communications., 109 (2), 513-517, (1982).
- 16) Phlich, E. and Hoffman, J., On the mechanism of action of glutamate dehydrogenase from pea seedlings and the regulation of the activity by adenosine phosphates, the energy charge and ions, *Planta*, 122, 185-201, (1975).
- 19) Hauen, W. and Hartman, T., Glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* L., *Planta*, 148, 7-16, (1980).
- 20) McKenzie, E. and Lees, E. M., Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzymes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212, 290-297, (1981).
- 21) Yamasaky, K. and Suzuki., Some properties of glutamate dehydrogenase from pea seedlings, *Phytochem.*, 8, 963-969, (1969).
- 22) King, J. and Wu, Yung-Fan, Partial purification and kinetic properties of glutamic dehydrogenase from soybean cotyledons, *Phytochemistry*, 10, 915-928, (1971).
- 23) Hesselhut, th. and Harnischfeger, G., Properties of glutamate dehydrogenase from *Beta vulgaris*, *Physiol. Plant.*, 50, 1-5, (1950).
- 24) Nagel, Marianne and Hartmann, Thomas, Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L., purification and comparative kinetic studies of the organ-specific multiple forms, *Z. Naturforsch.* 35c, 406-415, (1950).
- 25) Hartmann, T., Endogenously and exogenously caused alteration of the isoenzyme pattern of NAD-specific glutamic dehydrogenase in shoots in *Pisum sativum*, *Planta*, 111, 129-136, (1973).

- 26) Hartmann, T., Nagel, M. and Illert, H. J., Organspezifische multiple formen der glutamatdehydrogenase in Hedicago sativa, Planta, 111, 119-126, (1973).
- 27) Thurman, D. A., Palic, C. and Laycock, H. V., Isoenzymatic nature of L-glutamic dehydrogenase of higher plants. Nature, 207, 193-194, (1965).
- 28) Yakovleva, V. I., Krctovich, V. L. and Gil'manov, M. K., Glutamate dehydrogenase of corn roots, Biokhimiya, 29, 896-904, (1964).
- 29) Kanamori, T., Konishi, S. and Takahashi, E., Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media, Physiol. Plant., 26, 1-6, (1972).
- 30) Bielanski, W. and Rafalski, Glutamate dehydrogenase and glutamine syntetase rye seedlings supplied with ammonium and nitrate, Acta Biochimica Polonica, 26, 383-395, (1979).
- 31) Dalling, M. J., Tolbert, N. E. and Hageman, R. H., Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. II. Wheat roots, Biophys. Acta, 283, 513-519, (1970).
- 32) Kretovich, V. L., Karyakina, and Sidel'nikova, L. I., Regulation of glutamate dehydrogenase of wheat seedlings by ammonium salts, Dokl Akad. Nauk SSSR, 208, 464-467, (1973).
- 33) Suzuki, Gadal, A. P. and Oasks, A., Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots, Planta, 151, 457-461, (1981).
- 34) Miflin, B. J., Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots, Planta, 93, 160-170, (1970).

- 35) Davies, D. D., Soluble enzymes from pea mitochondria, *J. Exp. Bot.*, 7, 203-218, (1956).
- 36) Pahlich, E., Ott, W. and Schad, B., Immunochemical investigations with highly purified glutamate dehydrogenase from pea seeds by means of the Oucherlony test, *J. of Exp. Bot.*, 31, 419-423, (1980).
- 37) Yue, S. B., Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants, *Plant. Physiol.*, 44, 453-457, (1969).
- 38) Magalhaes, A. C., Neyra, C. A. and Hageman, R. H., Nitrate assimilation and amonio nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplasts., *Plant. Physiol.*, 53, 411-415, (1974).
- 39) Lea, P. J. and Thurman, D. A., Intracellular location and properties of plant L-glutamate dehydrogenase, *J. of Exp. Bot.*, 23, 440-449, (1972).
- 40) Fawole, M. O., Glutamate dehydrogenase from *Vicia faba*, *Can. J. Bot.*, 55, 1850-1856, (1977).
- 41) Mellor, Gary E. and Tregunna E. B., The localization of nitrate-assimilating in leaves of plants with the C₄-ptway of photosynthesis, *Can. J. of Botany*, 49, 137-142, (1970).
- 42) Yakovleva, V. I., Kretovich, V. L. and Goretov, V. P., Purification and determination of properties of glutamate dehydrogenase from plants, *Biokhimiya*, 31.887-892, (1966).
- 43) Ritenour, G. L., Joy, K. W. and Hageman, R. H., Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamic acid dehydrogenase in green laef tissue, *Plant. Physiol.*, 42, 233-237, (1967).

- 44) Nicklisch, A., Interrelation between the pattern of multiple forms and the function of glutamate dehydrogenase in Zea mays L., Biochem. Physiol. Pflanzen, 174, 80-84, (1979).
- 45) Quetz, P. Q., Tischner, R. and Lorenzen, H., Changes in the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism in maize seedling dependent on different nitrogen sources, Biochem. Physiol. Pflanzen, 177, 567-576, (1982).
- 46) Ramirez, H., Delgado, Ma. J. and Garcia-Peregrin, E., Some properties of glutamate dehydrogenase from Agave americana L. leaves, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 84(2), 109-119, (1977).
- 47) Andrews, P., The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range, Biochem. J., 96, 595-606, (1965).
- 48) Garcia-Peregrin, E., Suarez, M. D., Aragon, H. C., and Mayor, F., Mevalonato phosphorylation in Agave americana, Phytochemistry, 11, 2495-2498, (1972).
- 49) Peterson, Gary L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, Analytical Biochemistry, 83, 346-356, (1977).
- 50) Shatilov, Valery R and Sund, Horst, Glutamate dehydrogenase of the unicellular green alga Scenedesmus acutus, Planta, 157, 367-370, (1983).