

Formas moleculares de glutamato deshidrogenasa, NADP (H) dependiente, producidas por acción del L-usnato sódico

C. Vicente, H. Guerra y María Teresa Valle

Departamento de Fisiología Vegetal
Laboratorio de Fisiología de Líquenes
Facultad de Ciencias
Salamanca

(Recibido el 3 de septiembre de 1973)

C. VICENTE, H. GUERRA and MARIA TERESA VALLE. *Molecular Forms of Glutamate Dehydrogenase, NADP (H)-linked, Produced by Action of Sodium L-usnate*. Rev. esp. Fisiol, 29, 301-306. 1973.

Glutamate dehydrogenase, NADP(H)-linked, has been purified 100 times from *Proteus mirabilis* with a recuperation of 55.8 %. The sodium salt of L-usnic acid provokes an aggregation state of glutamate dehydrogenase molecules having this aggregate the characteristics of a michaelian kinetic.

De entre las principales propiedades de los compuestos liquénicos, han sido estudiadas preferentemente su capacidad de quelación de cationes inorgánicos (9), su actividad antibiótica (2) y sus efectos como inactivadores de enzimas (8). A este respecto, ha sido recientemente demostrado que la inactivación de ureasa por la sal sódica del ácido L-úsrico es debida a la formación de agregados de alto peso molecular por establecimiento de un puente entre restos L-alanil y L-prolil de diferentes cadenas polipeptídicas (11). La actividad antibiótica de tal compuesto estaría en función de inactivaciones enzimáticas y desacoplamiento de cadenas de fosforilación oxidativa.

En el presente trabajo se estudia el efecto del L-usnato sódico sobre la acti-

vidad, constantes cinéticas y formas moleculares de una glutamato deshidrogenasa, NADP(H) dependiente, purificada a partir de *Proteus mirabilis*.

Material y métodos

Proteus mirabilis, NCIB 5887, se cultivaba sobre medios líquidos inorgánicos, descritos previamente (7), suplementados con glucosa 0,1 M como fuente de carbono e inductor de glutamato deshidrogenasa, y sulfato amónico 0,1 M como fuente de nitrógeno. Los cultivos se llevaban a cabo en aerobiosis, con una agitación de 120 oscilaciones por minuto, y a 37 grados. El crecimiento se estimaba como incremento en la densidad óptica a 910 nm, longitud de onda recomendada

por MANSO (7) para medios líquidos que contienen ácido nicotínico. Para medidas de actividad enzimática se recogían las células por centrifugación a $14.000 \times g$ durante 20 minutos, a 4° , en una centrífuga Sorvall SS-1, se lavaban con suficiente cantidad de tampón fosfato 1 mM de pH 7,7 y se preparaban polvos acetónicos por tratamiento de las células lavadas con 2-mercapto etanol 0,14 M en acetona pura (6). Los polvos acetónicos, secados a vacío, se resuspendían en suficiente cantidad del tampón citado, se mantenían durante una hora a 4° y posteriormente se centrifugaban a la misma temperatura, durante 20 minutos a $26.500 \times g$. El sobrenadante, o extracto libre de células, se utilizaba para valorar la actividad enzimática. Para estimar esta actividad se mezclaban en un volumen final de 3 ml 20 μ moles de ácido α -cetoglutarico, 240 micromoles de cloruro amónico, 0,4 μ moles de NADPH (Sigma Chemical Co.) y aproximadamente en cada ensayo 30 μ g de proteína, completando el volumen indicado con tampón fosfato 10 mM de pH 7,7. La oxidación del NADPH se estimaba como descenso en la densidad óptica a 340 nm, seguida durante 5 minutos, a 20° , en un espectrofotómetro Beckman DK-2, siendo un descenso de 0,1 unidades de densidad óptica por mg de proteína y minuto una unidad de actividad específica (3).

Las proteínas de los extractos se valoraban por el método de LOWRY *et al* (5). El gel de fosfato cálcico se preparaba según las indicaciones de LEGGET-BAILEY (4) equilibrándolo con tampón fosfato 1 mM de pH 7,7. La cromatografía de adsorción se llevaba a cabo por adición a la muestra de 75 mg en peso seco del gel por mg de proteína y se eluía incrementando la concentración de tampón de idéntico pH desde 1 a 200 mM. La filtración por Sephadex G-200 (Pharmacia, Upsala) se llevaba a cabo en columnas de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro, equilibradas con tampón fosfato 5 mM

de pH 7,7, eluyendo las fracciones por adición del mismo tampón. La filtración a través de Sepharosa 6B (Pharmacia, Upsala) se llevaba a cabo en columnas de idénticas dimensiones a las anteriormente descritas, equilibradas con tampón fosfato 1 mM de pH 7,7.

El L-usnato sódico fue preparado en este laboratorio a partir de ácido L-úsico (Läke Oy, Turku), de acuerdo con las instrucciones de SHIBATA (10).

Resultados

Para estudiar el efecto del L-usnato sódico sobre la actividad glutamato deshidrogenásica se procedió a purificar el enzima a partir de cultivos de *Proteus mirabilis* que habían crecido durante 6 horas en el medio descrito, tiempo de óptima inducción por glucosa (7). Al extracto libre de células se le adicionaba sulfato amónico hasta alcanzar una concentración del 75 % de saturación. Después de dejarlo reposar durante una hora a 4° se centrifugaba a $26.500 \times g$ durante 20 minutos a la misma temperatura. El precipitado se resuspendía en 5 ml de tampón fosfato 1 mM de pH 7,7 y sobrenadante y precipitado se dializaban frente a idéntico tampón durante 5 horas a 4° , cambiando tres veces el baño de diálisis.

El sobrenadante, que contiene toda la actividad glutamato deshidrogenásica, se pasaba entonces por un lecho de gel de fosfato cálcico, preparado según se describe en Métodos, y la proteína adsorbida se eluía con tampones fosfato de idéntico pH, aumentando su concentración de 1 a 200 mM. El mayor pico de actividad correspondía a la fracción eluida con tampón fosfato 5 mM. Esta fracción se pasaba entonces por una columna de Sephadex G-200, realizándose la elución con volúmenes de 10 ml del mismo tampón, correspondiendo la máxima actividad a la fracción eluida a los 113 ml de filtrado.

La purificación final es de 100 veces con respecto al extracto libre de células, y re-

presenta una recuperación del 55,8 % (tabla I).

Las características cinéticas de esta preparación purificada de glutamato deshidrogenasa fueron estudiadas variando la concentración de NADPH en las mezclas de reacción. La cinética del enzima es típicamente alostérica con respecto a la variación de sustrato (NADPH), como la de todas las glutamato deshidrogenasas de diferentes organismos estudiadas hasta ahora (fig. 1). Sin embargo, la preincubación del enzima como 0,4 μ moles de NADPH, en un volumen de 2,6 ml, durante cinco minutos, en ausencia de ácido α -cetoglutarico y cloruro amónico, revela al NADPH como efector positivo del enzima. Completando el volumen de reacción a 3 ml mediante la adición del resto de los sustratos, la cinética cambiaba a una recta que correspondería a una cinética micelaiana de orden cero (fig. 1). Un cambio en esta forma es típico de esta clase de enzimas cuando son preincubados con un efector alostérico (1), el NADPH en este caso.

Cuando el enzima, en ausencia de efector, era preincubado durante 5 minutos con 14 μ g de L-usnato sódico, disueltos en ClNa al 2,5 %, añadiendo después sustratos y coenzima, la cinética mostraba ser hiperbólica, existiendo una activación con

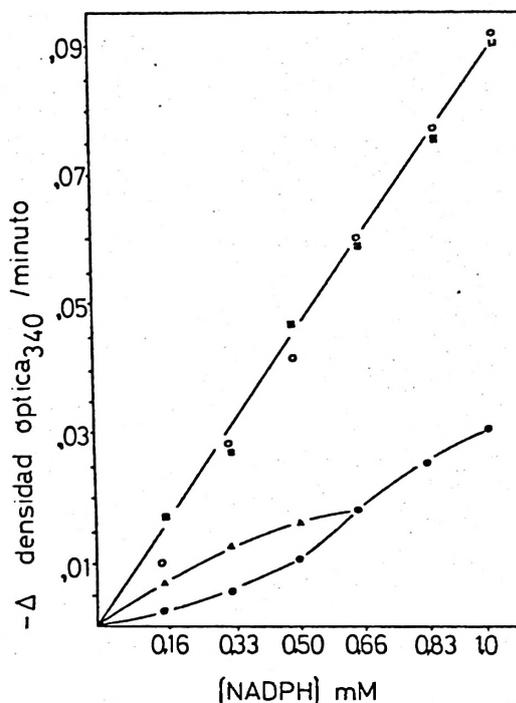


Fig. 1. Cinética de glutamato deshidrogenasa de *Proteus mirabilis* en función de la variación en las concentraciones de NADPH.

(●) sin preincubación previa; (○) preincubando el enzima con 0,4 μ moles de NADPH durante 5 minutos; (▲) preincubando el enzima con 14 μ g de L-usnato sódico durante 5 minutos; (■) preincubando con 0,4 μ moles de NADPH durante 5 minutos y posteriormente con 14 μ g de L-usnato sódico durante 5 minutos.

Tabla I. Purificación de glutamato deshidrogenasa de *P. mirabilis*.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (unidades)	Actividad total	Purificación	Recuperación (%)
Extracto libre de células	10,0	1,43	0,03	0,430	—	100,0
Sobrenadante del tratamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 75 % de saturación	10,3	0,038	0,52	0,40	17,3	93,0
Fracción 3 de la cromatografía en gel de fosfato cálcico *	10,0	0,02	1,8	0,36	60,0	83,7
Fracción 12 de la filtración a través de Sephadex G-200 **	10,0	0,008	3,0	0,24	100,0	55,8

* Fracción eluida con tampón fosfato 5 mM de pH 7,7.

** Correspondiente a los 113 ml de filtrado. Se estima en 63 ml el volumen muerto de la columna.

respecto a la cinética sigmoidal típica, para concentraciones de NADPH que iban desde 0,16 a 0,66 mM. Este efecto era anulado cuando el enzima era preincubado con el efector alostérico antes de la adición del L-usnato sódico (fig. 1).

La velocidad de la reacción enzimática lograda en presencia del L-usnato sódico para concentraciones de NADPH superiores a 0,66 mM dibujaba una cinética muy

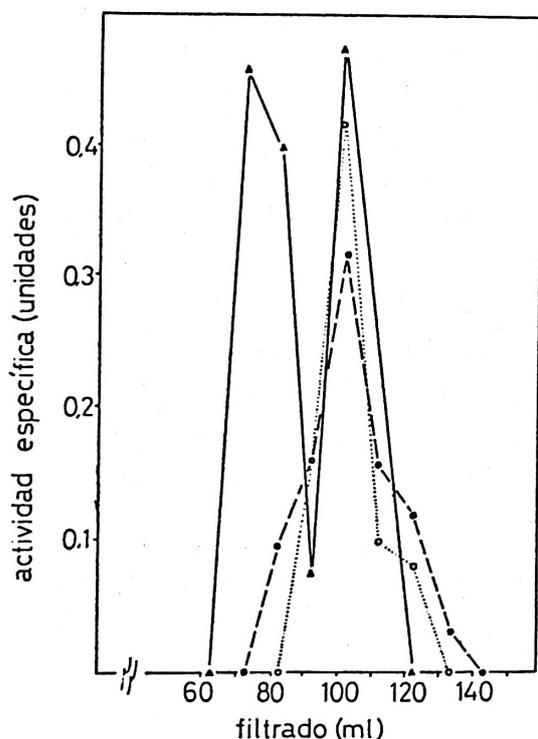


Fig. 2. Filtración de glutamato deshidrogenasa a través de una columna de Sepharosa 6B, de 21 x 2 cm, equilibrada con tampón fosfato 1 mM de pH 7,7.

La elución se realizaba por adición de fracciones de 10 ml del mismo tampón.

(●) enzima sin ningún tratamiento previo; (○) enzima preincubado durante 5 minutos con NADPH y posteriormente con L-usnato sódico durante 5 minutos; (▲) enzima preincubado durante 5 minutos con L-usnato sódico. Se estima en 63 ml el volumen muerto de la columna. La medida de actividad se lleva a cabo en este caso utilizando 20 μ g de proteína en lugar de 30 μ g como se describe en Métodos.

irregular, de difícil representación gráfica, por lo que no ha sido incluida en la figura 1. Esta irregularidad podría ser debida a la superposición de dos tipos de cinéticas, alostérica y micaliana, o lo que es igual, sigmoidal e hiperbólica, lo que implicaría que, después del tratamiento con L-usnato sódico, coexistían en la misma preparación dos formas moleculares de glutamato deshidrogenasa, una afectada por el antibiótico (cinética micaliana) y otra no afectada por él (cinética alostérica).

Para confirmar esta hipótesis se pasaron por una columna de Sepharosa 6B, de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro, equilibrada con tampón fosfato 1 mM de pH 7,7, tres preparaciones de glutamato deshidrogenasa purificada, la primera de ellas sin ningún tratamiento previo, la segunda preincubada durante 5 minutos con L-usnato sódico (14 μ g/ml) y posteriormente dializada durante 5 horas frente a tampón fosfato 1 mM de pH 7,7, y la ter-

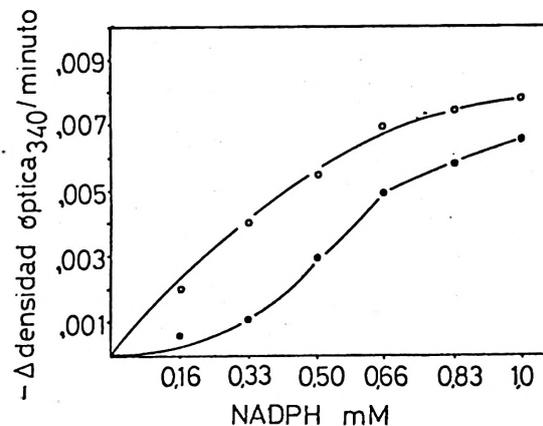


Fig. 3. Cinética de glutamato deshidrogenasa tratada con L-usnato sódico durante 5 minutos y filtrada a través de una columna de Sepharosa 6B.

(○) fracción de glutamato deshidrogenasa eluida a los 73 ml de filtrado (fracción pesada); (●) fracción eluida a los 103 ml de filtrado (fracción de bajo peso molecular). La medida de velocidad de reacción se lleva a cabo utilizando 20 μ g de proteína en lugar de 30 μ g como se describía en Métodos.

cera preincubada con NADPH (0,4 μ moles/ml) durante 5 minutos, después con L-usnato sódico (14 μ g/ml) durante 5 minutos y posteriormente dializada en las mismas condiciones que la anterior. La primera y tercera preparaciones fueron eluidas de la columna, mediante adiciones de 10 ml de idéntico tampón, en un único pico de actividad, coincidente en ambos casos, mientras que la segunda preparación dio dos picos de actividad, el primero de ellos eluido 32 ml antes que las anteriores preparaciones y el segundo coincidente con éstas (fig. 2).

Esto indicaría que, como se había sospechado, el L-usnato sódico altera parte de las moléculas de glutamato deshidrogenasa, alteración consistente en un aumento del peso molecular, quizá debido a la formación de estados de agregación. Las cinéticas de ambas formas moleculares, representadas en la figura 3, demostrarían de nuevo estos hechos. La forma de glutamato deshidrogenasa de alto peso molecular, producida por acción del L-usnato sódico, presenta una típica cinética miceliana, sin ninguna irregularidad a lo largo de toda la gama de concentraciones de NADPH, mientras que la forma de bajo peso molecular, no afectada por el antibiótico, presenta la típica cinética alostérica.

Discusión

La purificación de glutamato deshidrogenasa de *Proteus mirabilis* por procedimientos de rutina presentó el interés de una alta recuperación en la actividad total, por lo que se desistió de aplicar nuevos tratamientos, manteniendo de esta forma una cantidad moderadamente alta de proteínas.

La preparación de glutamato deshidrogenasa 100 veces purificada respondió a unas características cinéticas típicas de un enzima alostérico. Fue interesante constatar que el NADPH, coenzima de la reacción de aminación, se comportaba como efector positivo del enzima cuando éste

era preincubado durante 5 minutos con aquél. Un efecto semejante se obtenía cuando la preincubación se llevaba a cabo con L-usnato sódico. Como se ha descrito en Resultados, la preincubación del enzima con NADPH antes de la adición de L-usnato sódico anulaba la acción de éste. Al ser las rectas correspondientes a ambos tratamientos coincidentes, el efecto de activación en ambos casos debe considerarse función exclusiva del efector alostérico, lo que conduciría a la conclusión de que la unión del efector a sus centros alostéricos en el enzima impide la unión del L-usnato sódico a la proteína enzimática.

Los datos previos encontrados sobre la acción del L-usnato sódico sobre las formas moleculares de ureasa (11) no dejan lugar a dudas respecto a la unión del antibiótico con la proteína enzimática. La formación de agregados de glutamato deshidrogenasa de mayor peso molecular que el enzima nativo, demostrada por filtración a través de Sepharosa 6B, posiblemente se lleve a cabo de igual manera que para la ureasa, por formación de puentes entre diversas cadenas polipeptídicas. Estos agregados presentarían cinéticas micelianas frente a una variación en las concentraciones de NADPH.

Resumen

Ha sido purificada a partir de *Proteus mirabilis* una glutamato deshidrogenasa, NADPH dependiente, que presenta una típica cinética alostérica frente a la variación en las concentraciones del coenzima. La preincubación del enzima con L-usnato sódico revierte la cinética alostérica en miceliana, estando este efecto relacionado con la formación de agregados de alto peso molecular de glutamato deshidrogenasa por acción del L-usnato sódico.

Bibliografía

1. ATKINSON, D. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 85, 1966.
2. BUSTINZA, F.: *Endeavour*, **10**, 95, 1951.
3. HOOPER, A. B., HANSEN, J. y BELL, R.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 288, 1967.

4. LEGGET-BAILEY, J.: «Techniques in Protein Chemistry», Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1967, p. 268.
5. LOWRY, O. H., ROSENROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
6. MAMIYA, G. y GORIN, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 382, 1965.
7. MANSO, R.: *Rev. Patron. Biol. Anim.*, **15**, 147, 1971.
8. MANSO, R. y VICENTE, C.: *Microbiol. Españ.*, **24**, 123, 1971.
9. SCHATZ, A.: *Jour. Agr. Food. Chem.*, **11**, 112, 1963.
10. SHIBATA, S.: En «Modern Methods of Plant Analysis». Vol. 6 (PAECH, K. y TRACEY, M. V., eds.), Springer Verlag, Berlín, 1963, pág. 155.
11. VICENTE, C., GUERRA, H. y VALLE, M. T.: Pendiente de publicación.