

Cinética de la glutamato oxalacetato transaminasa soluble y mitocondrial de hígado de pollo

M. Busquets, A. Elduque,* A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona - 14

(Recibido el 14 de noviembre de 1977)

M. BUSQUETS, A. ELDUQUE, A. CORTES and J. BOZAL. *Kinetics of Chicken Liver Mitochondrial and Cytoplasmic Glutamate Oxalacetate Transaminase*. Rev. esp. Fisiol., 34, 213-218, 1978.

Electrophoresis at pH 7.4, on cellulose polyacetate strips, and specific staining, show the occurrence of two molecular forms of the mitochondrial and soluble isozymes from chicken liver aspartate aminotransferase.

The optimum pH of the cytoplasmic enzyme with L-aspartate and α -ketoglutarate as substrats is approximately 7, while the mitochondrial one is practically unaffected in the interval 6-8.

The kinetic reactional mechanism is of ping-pong bi-bi type for both enzymes, as confirmed by the method of Garces-Cleland, and their inhibitions by excess of the substrates L-aspartate and α -Ketoglutarate are competitive, in accordance with the proposed mechanism.

La lanzadera del malato-aspartato constituye un mecanismo reversible de transporte de equivalentes de reducción a través de la membrana mitocondrial interna. La capacidad reductora del NADH citoplasmático penetra, mediante este sistema, en la mitocondria en forma de L-malato, produciéndose de nuevo el NADH que es utilizado por la cadena respiratoria (1).

Por el contrario, los equivalentes de reducción generados en la degradación oxi-

dativa de los ácidos grasos pueden transportarse al citoplasma para ser empleados en la gluconeogénesis (13).

Esta lanzadera reversible transcurre con el concurso de los isoenzimas mitocondrial y citoplasmático de la malato-des-hidrogenasa (E.C.: 1.1.1.37) y de la glutamato-oxalacetato transaminasa (E.C.: 2.6.1.1).

En el proceso citado ambos enzimas actúan secuencialmente en la mitocondria y en el citoplasma; es de esperar, por tanto, que existan entre ellos estrechas relaciones. Recientemente (2, 5) se ha descrito la posible formación de complejos tanto entre los dos enzimas mitocondria-

* Becario del Ministerio de Educación y Ciencia.

les como entre los dos citoplasmáticos.

El objeto de este trabajo es el estudio de las características electroforéticas y cinéticas de las formas mitocondrial y citoplasmática de la glutamato-oxalacetato transaminasa de hígado de pollo. Su conocimiento puede permitir relacionarlos con los correspondientes isoenzimas de la malato-deshidrogenasa, cuyas características ya han sido determinadas (3).

Material y métodos

Los enzimas se obtienen por homogeneización en un Potter-Elvehjem del tejido hepático de pollo en un medio isotónico de sacarosa 0,25 M, a 4° C. Las fracciones mitocondrial y soluble se separan por centrifugación diferencial, según el método de HOGEBOM *et al.* (11). La ruptura completa de las mitocondrias se provoca por suspensión en un medio de tampón de fosfato sódico 100 mM de pH 7,4, 90 min, a 4° C. El isoenzima mitocondrial y el presente en la fracción citoplasmática se obtienen llevando las disoluciones respectivas al 80 % de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado enzimático de ambas procedencias así obtenido se conserva congelado a -20° C. Los diversos experimentos se efectúan con el preparado dializado frente a tampón de fosfato sódico 100 mM de pH 7,4, durante 24 h a 4° C.

Los reactivos empleados son L-aspartato y α -oxoglutarato (Merck), NADH, NAD⁺ y malato-deshidrogenasa (Boehringer), albúmina bovina, polivinilpirrolidona y fosfato de piridoxal (Sigma) y cloruro de 6-benzamido-4-metoxi-m-toluidina diazonio (Koch-Light).

La determinación de la actividad glutamato-oxalacetato transaminasa se lleva a cabo según el método de KARMEN (12) utilizando $[\text{NADH}] = 0,1$ mM y malato-deshidrogenasa 1,76 U/ml. en un espectrofotómetro Beckman, modelo 25, por medida de los decrementos de absorbancia a $\lambda = 340$ nm, en cubetas de 3 ml y

1 cm de paso de luz, a $30^\circ \text{C} \pm 0,1^\circ \text{C}$. Las experiencias cinéticas se han efectuado, generalmente, utilizando tampón de fosfato sódico 100 mM de pH 7,4.

Las electroforesis sobre soporte de poliactato de celulosa (cellogel) se efectúan en medio de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, durante 2 h, con una diferencia de potencial de 200 volts.

La actividad del enzima se pone de manifiesto con el revelador específico de DECKER y RAU (8) (tampón de fosfato sódico 100 mM de pH 7,4, L-aspartato 34 mM, α -oxoglutarato 7 mM, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fosfato de piridoxal, 1,2 mg/ml de albúmina bovina, 75 mg/ml de polivinilpirrolidona y 5 mg/ml de cloruro de 6-benzamido-4-metoxi-m-toluidina diazonio).

El análisis de los datos cinéticos se efectúa por los métodos propuestos por CLELAND (6) y FLORINI-VESTLING (9) y las inhibiciones por exceso de sustrato del enzima de ambas procedencias por el método de DALZIEL (7).

Resultados

Electroforesis de las fracciones citoplasmática y mitocondrial. El revelado específico de los ferogramas correspondientes a las fracciones indicadas pone de manifiesto la existencia de 2 bandas con movilidad anódica a pH 7,4 (fig. 1) tanto en la glutamato-oxalacetato transaminasa soluble como en la mitocondrial. Aunque la movilidad de las bandas es análoga en el enzima de ambas procedencias, sus intensidades relativas son marcadamente diferentes. Así, en el enzima citoplasmático la banda más móvil es la que presenta mayor intensidad, mientras que en el mitocondrial predomina, aparentemente, la menos móvil. En la electroforesis de los preparados parcialmente purificados de ambos enzimas se obtienen resultados análogos.

Determinación del pH óptimo. El pH óptimo de actuación de los dos enzimas

presentes en los homogeneizados de hígado de pollo se determina en un medio de tampón de fosfato sódico 100 mM, en el margen de pH 5,5-8. La concentración de

ambos sustratos es 5 mM con el enzima mitocondrial y con el soluble 2 mM y 20 mM en α -oxoglutarato y L-aspartato, respectivamente. El enzima mitocondrial muestra una amplia meseta que abarca todo el intervalo de pH ensayado, mientras que la glutamato-oxalacetato transaminasa soluble presenta un máximo de actividad a pH comprendido entre 6,8 y 7,1; en la zona ácida el decremento de actividad es muy acusado.

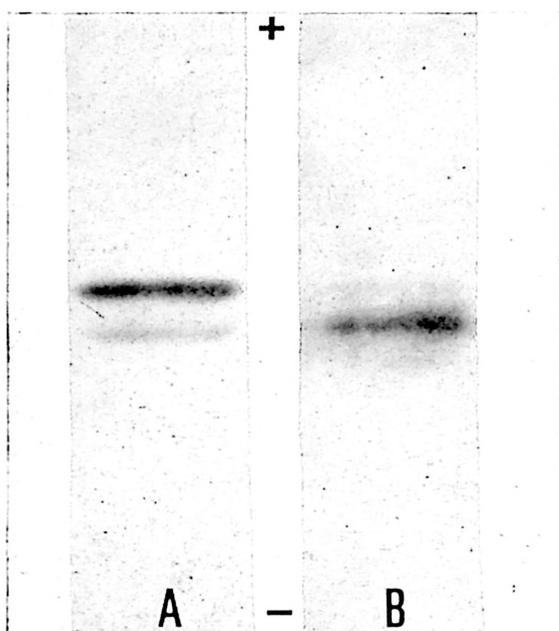


Fig. 1. Formas moleculares de la glutamato oxalacetato transaminasa de hígado de pollo. A) Enzima soluble. B) enzima mitocondrial.

Cinética con L-aspartato y α -oxoglutarato como sustratos. En la determinación de las velocidades iniciales, la representación doble recíproca de v vs. $[S]$, proporciona rectas paralelas con el enzima citoplasmático (fig. 2); con el mitocondrial, en análogas condiciones y en un margen de concentraciones 2-20 mM de ambos sustratos, se obtiene el mismo resultado.

Los valores de los parámetros cinéticos reales, determinados por el método de FLORINI-VESTLING (*loc. cit.*) aparecen en la tabla I.

Al objeto de dilucidar si la obtención de rectas paralelas en la representación doble recíproca (fig. 2) corresponde a un

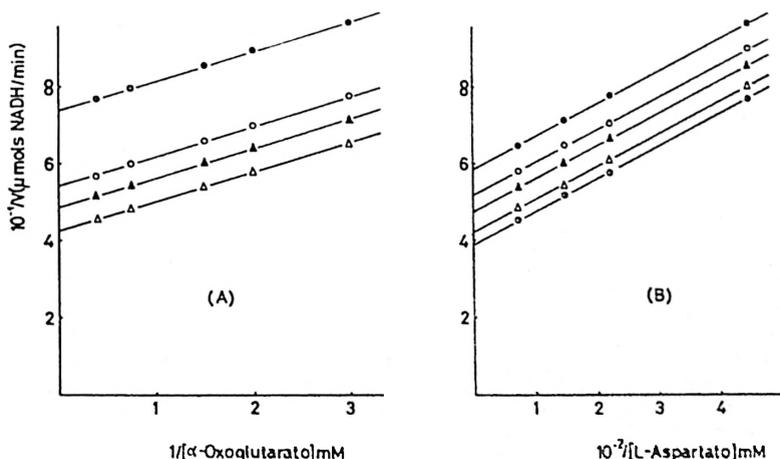


Fig. 2. Velocidades iniciales de reacción del sistema L-aspartato-Glutamato oxalacetato transaminasa soluble- α -oxoglutarato.

A) [L-aspartato] mM, de arriba a abajo: 2,22; 4,44; 6,67 y 13,33. B) [α -oxoglutarato] mM, de arriba a abajo: 0,33; 0,5; 0,67; 1,33 y 2,5.

Tabla 1. *Parámetros cinéticos reales y constantes de inhibición de la glutamato oxalacetato transaminasa.*

Constantes (mM)	Enzima mitocondrial	Enzima citoplasmático
K_M (L-Asp)	0,41	1,63
K_M (α -Ceto)	1,23	0,21
K_i (L-Asp)	25,00	426,00
K_i (α -Ceto)	4,50	24,70

mecanismo secuencial con el punto de intersección muy alejado del eje de ordenadas (K_{AB} muy pequeño) o es de tipo «ping-pong», se ha determinado la variación de las velocidades iniciales al variar la concentración de L-aspartato y mantenerse constante la relación de las concentraciones de L-aspartato y α -oxoglutarato. La ecuación general de un mecanismo «ping-pong» (6) se transforma, en el caso de la glutamato-oxalacetato transaminasa, en

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_{asp}}{V} + \frac{\beta K_{ceto}}{V} \right) \frac{1}{[asp]} + \frac{1}{V}$$

donde $\beta = [L-Asp]/[\alpha-Oxo]$. Por tanto, la representación de $1/v$ frente a $1/[L-Asp]$ para diversos valores de β debe originar líneas rectas cuya intersección tenga lu-

gar sobre el eje de ordenadas (10). En efecto, esto es lo que ocurre tanto para el isoenzima mitocondrial (fig. 3) como para el citoplasmático, confirmando que el me-

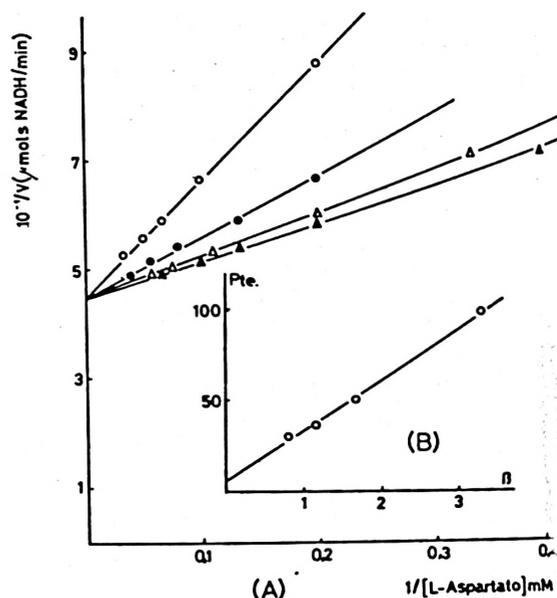


Fig. 3. *Velocidades iniciales de reacción a distintos valores de β (enzima mitocondrial). A) ($[L-asp]/[\alpha-oxo]$) de arriba a abajo: 3,33; 1,67; 1,11 y 0,83. B) Representación secundaria de las pendientes de las rectas obtenidas en la figura 3 A frente a los valores de β .*

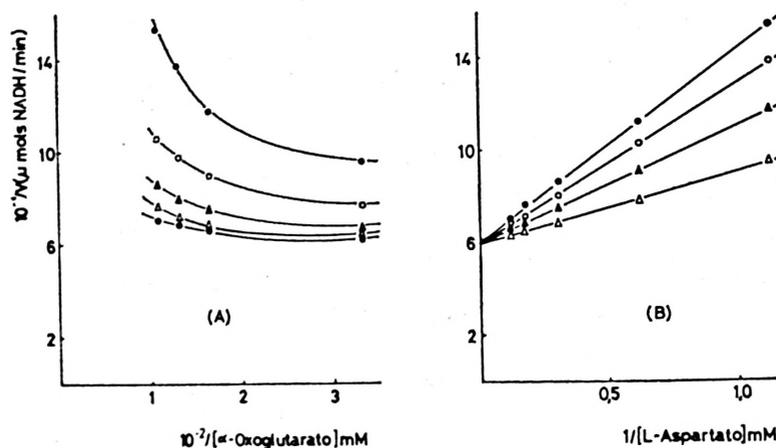


Fig. 4. *Inhibición por α -oxoglutarato del sistema L-aspartato-Glutamato oxalacetato transaminasa mitocondrial- α -oxoglutarato.*

A) $[L-aspartato]$ mM, de arriba a abajo: 0,8; 1,6; 3,2; 5,6 y 8. B) $[\alpha-oxoglutarato]$ mM, de arriba a abajo: 90; 75; 60 y 30.

canismo de actuación de ambas glutamato-oxalacetato transaminasas es de tipo «ping-pong». La representación de las pendientes de las rectas obtenidas frente a β ha permitido el cálculo de las constantes cinéticas reales, que concuerdan con las que aparecen en la tabla I.

Inhibición por exceso de los sustratos. La glutamato-oxalacetato transaminasa mitocondrial es inhibida por exceso de α -oxoglutarato (fig. 4) y por exceso de L-aspartato (200-560 mM); en ambos casos la inhibición es de tipo competitivo. El enzima citoplasmático también experimenta inhibición por exceso de L-aspartato (160-520 mM) y de α -oxoglutarato (4-68 mM), siendo igualmente de tipo competitivo. Los valores de las constantes de inhibición determinados por el método de DALZIEL (*loc. cit.*) aparecen en la tabla I.

Discusión

La actividad glutamato-oxalacetato transaminasa está localizada fundamentalmente en las fracciones soluble y mitocondrial de la célula. Mediante electroforesis de los homogeneizados de ambas procedencias se ha puesto de manifiesto la existencia de dos formas moleculares en ambos isoenzimas.

Con L-aspartato y α -oxoglutarato como sustratos, la actividad del enzima citoplasmático es máxima a $\text{pH} \approx 7$ y muestra un descenso de actividad apreciable en la zona ácida, mientras que la actividad de la glutamato oxalacetato transaminasa mitocondrial se mantiene prácticamente constante en el intervalo de pH estudiado, tal como se ha descrito para el enzima de otros orígenes (4).

Tanto el isoenzima mitocondrial como el citoplasmático adaptan su actuación a un mecanismo general de reacción de tipo «ping-pong», hecho que se pone de manifiesto por la aparición de rectas paralelas en la representación doble recíproca

de v vs. $[S]$ y se confirma por el método de GARCÉS-CLELAND (10).

El enzima de ambas procedencias se inhibe por exceso de los sustratos L-aspartato y α -oxoglutarato y la inhibición es de carácter competitivo, en concordancia con el tipo de mecanismo propuesto. Los valores de las constantes de inhibición son menores para la glutamato-oxalacetato transaminasa mitocondrial que para la citoplasmática, y ello sugiere que en el citoplasma se halla más favorecida la transformación de L-aspartato en oxalacetato que en el interior de la mitocondria. Pudieran correlacionarse estos valores con el hecho de que la malato-deshidrogenasa citoplasmática es más eficiente en el paso de oxalacetato a malato que su isoenzima mitocondrial, que actúa preferentemente en la oxidación del L-malato.

Resumen

Mediante electroforesis a pH 7,4, en tiras de poliacetato de celulosa y revelado específico, se pone de manifiesto la existencia de dos formas moleculares de los isoenzimas mitocondrial y soluble de la aspartato aminotransferasa de hígado de pollo.

El pH óptimo de actuación del enzima citoplasmático con L-aspartato y α -oxoglutarato como sustratos es aproximadamente 7, mientras que la actividad del mitocondrial no se ve prácticamente afectada en el intervalo de pH 6-8.

El mecanismo cinético de reacción es de tipo «ping-pong» para ambos enzimas, confirmado por el método de Garcés-Cleland, y sus inhibiciones por exceso de ambos sustratos L-aspartato y α -oxoglutarato son competitivas, de acuerdo con el mecanismo propuesto.

Bibliografía

1. ACKRELL, B. A. C.: *Horizons Biochem. Biophys.*, **1**, 175-219, 1974.
2. BACKMAN, L. y JOHANSSON, G.: *FEBS Letters*, **61**, 39-43, 1976.
3. BARÓ, J., CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 241-248, 1974.
4. BOYD, J. W.: *Biochem. J.*, **81**, 434-441, 1961.

5. BRYCE, C. F. A., WILLIAMS, D. C., JOHN, R. A. y FASELLA, P.: *Biochem. J.*, **153**, 571-577, 1976.
6. CLELAND, W. W.: *Biochim Biophys. Acta*, **67**, 104-137, 1963.
7. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706-1723, 1957.
8. DECKER, L. E. y RAU, E. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112**, 144-149, 1963.
9. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575-578, 1957.
10. GARCÉS, E. y CLELAND, W. W.: *Biochemistry*, **8**, 633-640, 1969.
11. HOGEBOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111-120, 1952.
12. KARMEN, A.: *J. Clin. Invest.*, **34**, 131-133, 1955.
13. NISSELBAUM, J. S., SWEETMAN, L. y KOPELOVICH, L.: En *Advances in Enzyme Regulation* (G. Weber, ed.), vol. **10**, Pergamon Press, Oxford, 1972, pp. 273-287.