

Mecanismo cinético de la malatodeshidrogenasa mitocondrial de hígado de pollo

F. Casadó, A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona-28 (España)

(Recibido el 15 de septiembre de 1978)

F. CASADO, A. CORTES and J. BOZAL. *Kinetic Mechanism of Chicken Liver Mitochondrial Malatedehydrogenase*. Rev. esp. Fisiol., 35, 229-238. 1979.

Kinetic mechanism of chicken liver mitochondrial malatedehydrogenase is established from the initial reaction rates and reaction product inhibition. The results obtained in the reduction of NAD^+ (pH 10) allow the formulation of an ordered bi-bi mechanism in which the coenzyme is the first substrate added to the enzyme.

Inhibition by the reaction products and by the excess of the very substrates, reveals the formation of the E-oxaloacetate; E-L-malate; E- NAD^+ -oxaloacetate; E- NAD^+ -NADH; E-NADH-NADH and E-NAD-NAD $^+$ abortive complexes, the significance of which may be checked under defined experimental conditions.

Enzyme inhibition by ATP, ADP and AMP in the reduction of NAD^+ (pH 10), accords with the proposed mechanism and proceeds via formation of the E-nucleotide and E- NAD^+ -nucleotide inactive complexes.

El mecanismo cinético propuesto para la malatodeshidrogenasa soluble y mitocondrial de diversos orígenes es básicamente de tipo secuencial ordenado bi-bi, y se ha deducido a partir de experiencias de intercambio isotópico (14) o de inhibición por los productos de la reacción (6, 8), habiéndose postulado la existencia de complejos binarios entre el enzima y el coenzima.

Con objeto de justificar el comportamiento cinético de las malatodeshidrogenasas de diversos orígenes ha sido preciso introducir algunas modificaciones en el mecanismo propuesto. Así, en la inhibi-

ción por producto del enzima soluble de corazón bovino se pone de manifiesto la presencia de complejos binarios, cinéticamente activos, del tipo enzima-oxalacetato (2). Por otra parte, los trabajos de HARADA y WOLFE (7), con el enzima mitocondrial de corazón de cerdo, sugieren que el mecanismo secuencial ordenado, que se había postulado para el enzima de esta procedencia (12), debe modificarse para interpretar la inhibición competitiva y acompetitiva del hidroximalonato frente al oxalacetato y al L-malato, respectivamente. Estos resultados indican que la malatodeshidrogenasa mitocon-

drial de corazón de cerdo se adapta a un mecanismo secuencial alternativo, para cuya formulación es preciso admitir la existencia de complejos activos que contengan el oxalacetato y el NADH en una subunidad de la molécula enzimática, mientras que en la otra se hallan localizados el L-malato y el NAD⁺. En el enzima de *Pennisetum purpureum* el mecanismo es totalmente distinto, ya que es de tipo iso ping-pong (4).

Al trabajar con extractos mitocondriales de hígado de pollo con actividad malatodeshidrogenásica, BARÓ *et al.* (1) demuestran que en presencia de oxalacetato y de NADH, al representar $1/v$ vs $1/[S]$, las rectas son aparentemente paralelas, en tanto que con el enzima soluble del mismo origen las rectas se cortan a la izquierda del eje de ordenadas. Ambos enzimas difieren, también, en el tipo de inhibición producido por exceso de oxalacetato respecto al NADH, que para el mitocondrial es no competitivo, mientras que con el enzima citoplasmático es de tipo incompetitivo.

En el presente trabajo se han determinado los parámetros cinéticos de la reacción que cataliza la malatodeshidrogenasa mitocondrial de hígado de pollo, con L-malato y NAD⁺ como sustratos, y el tipo de inhibición producido por los productos de la reacción y por el exceso de los sustratos.

El mecanismo que se deduce del estudio cinético se ha confirmado por el efecto que producen el ATP, el ADP y el AMP sobre la actividad enzimática, cuya acción se había sugerido que dependía de la procedencia del enzima (11, 13).

Material y métodos

Acido oxalacético (Fluka); ácido DL-málico (Merck); NAD⁺; NADH (Boehringer); ATP; ADP; AMP (Sigma) y Sephadex G-100 (Pharmacia).

La malatodeshidrogenasa mitocondrial

de hígado de pollo empleada se obtiene como se describe a continuación:

El hígado fresco troceado se suspende en sacarosa 0,25 M (1 g tejido/10 ml disolución) y se homogeniza en un Potter-Elvehjem a 4° C. La fracción mitocondrial se separa de las demás fracciones subcelulares por centrifugación diferencial (9) y se lava posteriormente con sacarosa 0,25 M hasta eliminación completa de la actividad del enzima soluble contaminante. El residuo se suspende durante 90 minutos en tampón de fosfato sódico 100 mM de pH 7,4, con lo que se consigue un rendimiento máximo en la extracción del enzima. La suspensión se centrifuga a $20.000 \times g$, 30 minutos a 4° C; la actividad enzimática se halla en el sobrenadante. A la disolución se le añade (NH₄)₂SO₄ hasta alcanzar el 80 % de saturación. El precipitado activo, separado por centrifugación a $10.000 \times g$, 30 minutos a 4° C, se disuelve en el tampón de fosfatos citado, frente al que se dializa para eliminar el precipitante. En un nuevo fraccionamiento se recoge el precipitado activo obtenido entre el 45 % y el 80 % de saturación en la sal y, una vez disuelto en el tampón de fosfatos, se dializa frente al mismo tampón. Después de centrifugar, el dializado se somete a cromatografía a través de una columna de Sephadex G-100 (3 × 70 cm), equilibrada con tampón tris-HCl 50 mM, pH 7,4, adicionado de KCl 100 mM; la elución se efectúa con el tampón de las características indicadas a una velocidad de 30 ml/h, recogiendo fracciones de 5 ml en un colector automático Gilson, y en las fracciones activas se precipita el enzima con etanol absoluto a 0° C (40-70 % v/v).

La actividad específica del preparado es de 315,4 U/mg proteína, que es unas 79 veces superior respecto de la de los sobrenadantes iniciales. El rendimiento global del proceso es del 37 %. La unidad enzimática es la cantidad de enzima que provoca la desaparición de un μmol

de sustrato por minuto a $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ y pH 7,4. Los estudios cinéticos realizados se han efectuado con este preparado enzimático.

El contenido en proteína se determina en todos los casos por el método de LOWRY (10), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

La actividad enzimática se determina por medida de la aparición del NADH a 340 nm a $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ en un espectrofotómetro Beckman modelo 25 provisto de inscriptor, con cubetas de cuarzo de 10 mm y 3 ml de capacidad, en un medio de tampón glicina-NaOH 50 mM de pH 10.

El análisis de los datos cinéticos se ha efectuado utilizando las predicciones teóricas de CLELAND (3). A partir de la representación doble recíproca de v frente a $[S]$, se deducen las representaciones secundarias de las pendientes e intersecciones de las rectas obtenidas, para establecer el carácter lineal o no lineal de las inhibiciones.

La inhibición por exceso de los sustratos se ha determinado por el método de DALZIEL (5) para sistemas birreactantes.

Resultados

Determinación del pH óptimo

Para el establecimiento del pH óptimo de la malatodeshidrogenasa mitocondrial con L-malato (5 mM) y NAD^+ (0,6 mM) como sustratos, se utiliza solución amortiguadora de glicina-NaOH 50 mM de pH 8,5-10,5. El pH óptimo se halla entre 9,8-10,2. Las experiencias cinéticas con dichos sustratos se efectuaron a pH 10, pero para evitar la pérdida de actividad del enzima a este pH, su disolución se mantiene a pH 7,4, donde conserva inalterada la actividad durante varias horas, y se vierte el volumen mínimo (0,1 ml) en la cubeta espectrofotométrica que contiene los demás componentes de la reacción, que se hallan a pH 10, y que garantizan que el valor se mantenga constante.

Velocidades iniciales de reacción con L-malato y NAD^+ como sustratos

Con el preparado purificado del enzima se ha determinado el efecto que producen

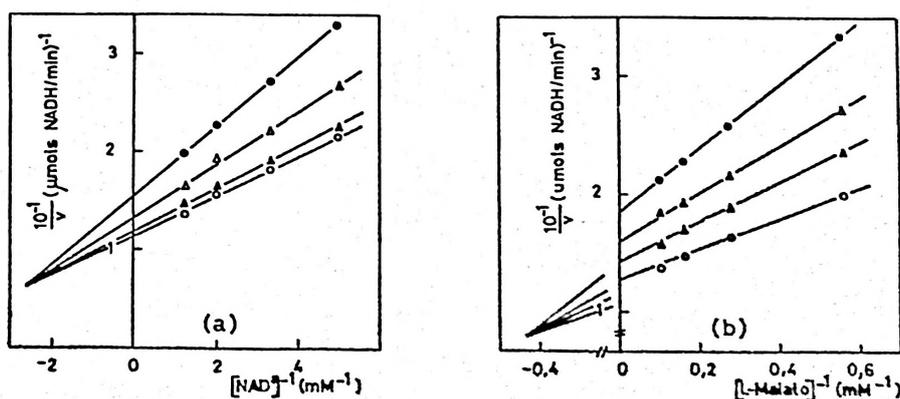


Fig. 1. Velocidades iniciales de reacción del sistema L-malato-malatodeshidrogenasa mitocondrial- NAD^+ .

(a) $[\text{L-malato}]$ mM, de abajo a arriba: 9; 6,3; 3,6 y 1,8.

(b) $[\text{NAD}^+]$ mM, de abajo a arriba: 0,8; 0,5; 0,3 y 0,2.

Tampón glicina-NaOH 50 mM, pH 10.

las concentraciones variables de uno de los sustratos, en presencia de distintas concentraciones del otro sustrato que se mantienen constantes. En la representación doble recíproca de los valores de v vs $[S]$ aparecen rectas no paralelas (fig. 1 a y b). Al aplicar las predicciones teóricas de CLELAND (3) a los resultados obtenidos, se deduce que con L-malato y NAD^+ el mecanismo general de la reacción es de tipo secuencial.

Las representaciones secundarias de las pendientes y de las intersecciones de las distintas rectas que aparecen en la figura 1,

permiten el cálculo de los parámetros cinéticos del sistema: K_M (L-malato) = 0,84 mM y K_M (NAD^+) = 0,15 mM.

Inhibición de la malatodeshidrogenasa mitocondrial. a) Por los productos de la reacción

Para dilucidar el mecanismo particular, a pH 10, del sistema catalizado por la malatodeshidrogenasa mitocondrial de hígado de pollo se ha determinado el tipo de inhibición ejercido por los productos con respecto a cada sustrato, en presen-

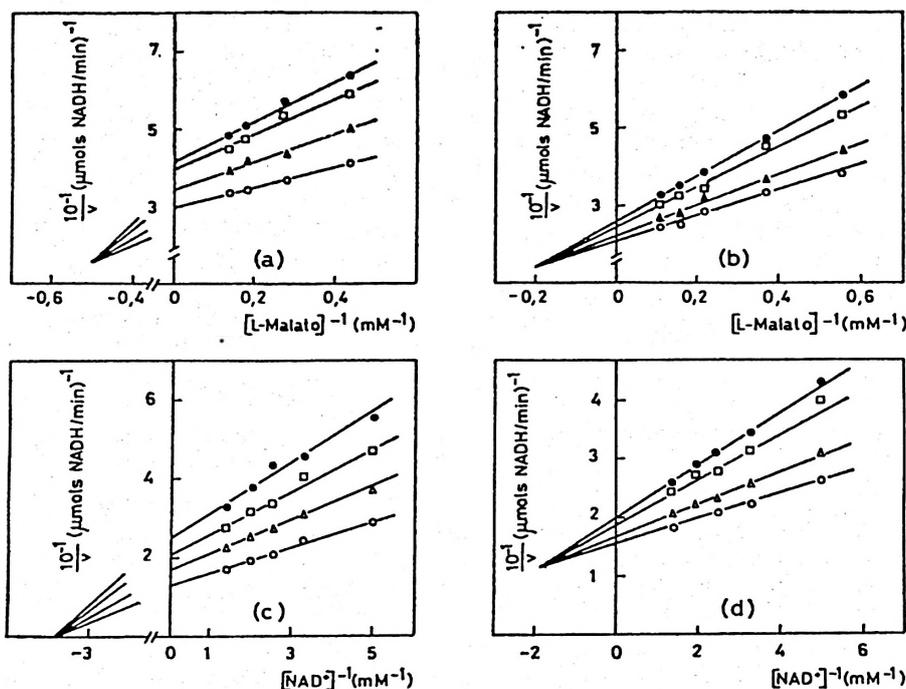


Fig. 2. Inhibición por oxalacetato del sistema L-malato-malatodeshidrogenasa mitocondrial- NAD^+ .

- (a) y (b) L-malato variable; (c) y (d) NAD^+ variable.
 (a) $[\text{NAD}^+] = 0,4$ mM (no saturante); (b) $[\text{NAD}^+] = 1$ mM (saturante).
 (a) [oxalacetato] mM, de abajo a arriba: 0; 0,06; 0,1 y 0,2.
 (b) [oxalacetato] mM, de abajo a arriba: 0; 0,05; 0,15 y 0,3.
 (c) [L-malato] = 3,6 mM (no saturante); (d) [L-malato] = 15 mM (saturante).
 (c) [oxalacetato] mM, de abajo a arriba: 0; 0,1; 0,2 y 0,35.
 (d) [oxalacetato] mM, de abajo a arriba: 0; 0,1; 0,3 y 0,5.
 Tampón glicina-NaOH 50 mM, pH 10.

cia de una concentración constante (saturante y no saturante) del otro sustrato.

El oxalacetato es un inhibidor no competitivo del enzima cuando el L-malato es el sustrato variable, aunque la concentración de NAD^+ sea no saturante o saturante (fig. 2 a y b). En ambos casos la representación secundaria de las pendientes frente a las concentraciones de inhibidor es no lineal, siendo lineal la de las intersecciones: $K_i = 0,3 \text{ mM}$ (NAD^+ no sat.); $K_i = 0,6 \text{ mM}$ (NAD^+ sat.).

Con NAD^+ como sustrato variable, la

inhibición por oxalacetato es también no competitiva, independientemente de la concentración constante de L-malato utilizada (fig. 2 c y d). Cuando la concentración de L-malato es no saturante, las representaciones secundarias de pendientes e intersecciones son no lineales; sin embargo, si es saturante, dichas representaciones son lineales, siendo $K_{ip} = 0,5 \text{ mM}$ y $K_{ii} = 1,67 \text{ mM}$.

El NADH es un inhibidor no competitivo con respecto al L-malato, tanto si la concentración de NAD^+ es no saturante

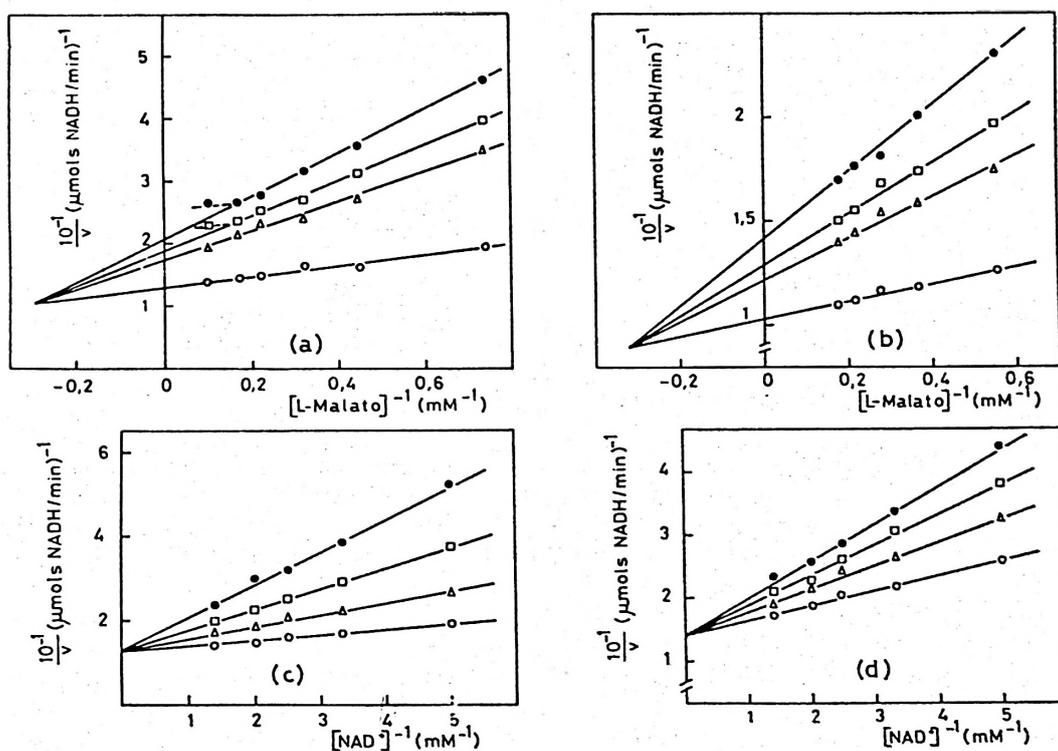


Fig. 3. Inhibición por NADH del sistema L-malato-malato deshidrogenasa mitocondrial- NAD^+ .

(a) y (b) L-malato variable; (c) y (d) NAD^+ variable.

(a) $[\text{NAD}^+] = 0,4 \text{ mM}$ (no saturante); (b) $[\text{NAD}^+] = 1 \text{ mM}$ (saturante).

(a) $[\text{NADH}] \text{ mM}$, de abajo a arriba: 0; 0,4; 0,8 y 0,12.

(b) $[\text{NADH}] \text{ mM}$, de abajo a arriba: 0; 0,12; 0,2 y 0,24.

(c) $[\text{L-malato}] = 3,6 \text{ mM}$ (no saturante); (d) $[\text{L-malato}] = 15 \text{ mM}$ (saturante).

(c) y (d) $[\text{NADH}] \text{ mM}$, de abajo a arriba: 0; 0,04; 0,08 y 0,12.

Tampón glicina-NaOH 50 mM, pH 10.

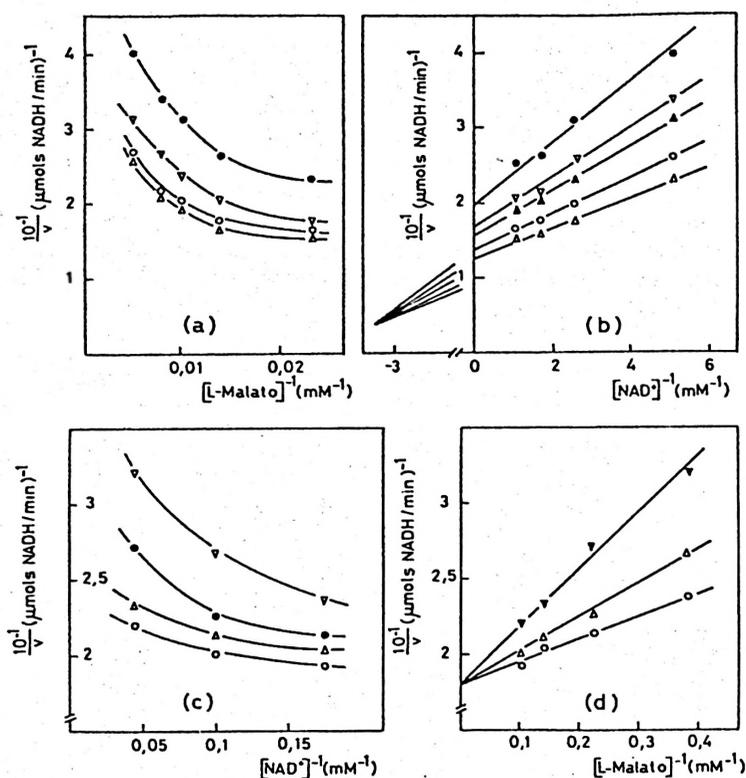


Fig. 4. Inhibición por exceso de los sustratos del sistema *L*-malatodeshidrogenasa mitocondrial- NAD^+ .

- (a) y (b) Inhibición por exceso de *L*-malato.
 (a) $[\text{NAD}^+]$ mM, de abajo a arriba: 1; 0,6; 0,4 y 0,2.
 (b) $[\text{L-malato}]$ mM, de abajo a arriba: 40; 72; 100; 130 y 176.
 (c) y (d) Inhibición por exceso de NAD^+ .
 (c) $[\text{L-malato}]$ mM, de abajo a arriba: 10,8; 7,2; 4,5 y 2,7.
 (d) $[\text{NAD}^+]$ mM, de abajo a arriba: 5,8; 10 y 22,5.
 Tampón glicina-NaOH 50 mM, pH 10.

o saturante (fig. 3 a y b), observándose desviaciones de la linealidad en las rectas inhibidas cuando la concentración del coenzima es no saturante. La representación secundaria de las pendientes y de las intersecciones es no lineal respecto de la concentración de inhibidor cuando el sustrato mantenido constante es no saturante; sin embargo, para una concentración constante y saturante de NAD^+ dichas representaciones son lineales, siendo $K_{ip} = 0,06$ mM y $K_{ii} = 0,26$ mM.

Al utilizar el NAD^+ como sustrato variable, independientemente de la concentración de *L*-malato, la inhibición por NADH es competitiva (fig. 3 c y d), lo que confirma que ambos cofactores, en el ciclo mecanístico, se fijan a la misma forma enzimática.

b) Por los sustratos en exceso

El *L*-malato (superior a 15 mM) inhibe no competitivamente al enzima por

exceso de sustrato respecto al NAD^+ (figura 4 a y b), siendo lineales las representaciones secundarias correspondientes: $K_{ip} = 150 \text{ mM}$ y $K_{ii} = 95 \text{ mM}$.

En la acción provocada sobre la actividad enzimática por un exceso de NAD^+ , se observa con el NAD^+ (1 mM-25 mM), que la velocidad inicial se mantiene constante a partir de la concentración saturante (1 mM). Sin embargo, si se mantienen en contacto previamente el enzima y el NAD^+ , y se inicia la reacción por adición del volumen apropiado de la mezcla de ambos a la cubeta espectrofotométrica que ya contiene el L-malato, la velocidad que se observa es menor que la que se obtiene por adición de una concentración análoga del enzima, carente de NAD^+ , a la cubeta en la que están presentes el L-malato y el NAD^+ en idéntica concentración a la del ensayo anterior. La disminución de velocidad depende del intervalo de contacto entre el enzima y el NAD^+ , y se estabiliza al cabo de 30 minutos de incubación. En estas condiciones el NAD^+ inhibe por exceso de sustrato (fig. 4 c) y la inhibición es de tipo competitivo y lineal respecto al L-malato (fig. 4 d), siendo $K_i = 5 \text{ mM}$. El resultado justifica la diferencia de velocidades observada según se inicie la reacción por adición de la mezcla E- NAD^+ o bien del enzima solo. En efecto, cuando se establece un contacto previo entre el enzima y el NAD^+ y la concentración de este último es superior a la saturante, el coenzima se fijará a su centro habitual, pero además lo hará en el centro de L-malato, mientras que si la reacción se inicia por adición del enzima a una mezcla que contiene NAD^+ y L-malato, al ser éste más afín por su centro de unión, impide la fijación en este centro por parte del NAD^+ .

Inhibición por ATP, ADP y AMP

Los resultados de las experiencias de inhibición a pH 10, por el ATP, el ADP

y el AMP, cuyas concentraciones están comprendidas en todos los casos entre 2 mM y 9 mM, se resumen en la tabla I. Se deduce que la acción de los nucleótidos se adapta a una cinética michaeliana, a diferencia de lo que ocurre con el enzima de *Escherichia coli* (13), y que con L-malato y NAD^+ como sustratos se observa que aquéllos ejercen una acción inhibitoria de tipo competitivo con respecto a ambos sustratos.

Tabla I. *Inhibición de la malatodeshidrogenasa mitocondrial por nucleótidos de adenina.*

Inhibidor	L-malato variable NAD^+ sat. 1 mM	NAD^+ variable L-mal. sat. 15 mM
ATP	C* ($K_i=1,7 \text{ mM}$)	C ($K_i=6,6 \text{ mM}$)
ADP	C ($K_i=2,4 \text{ mM}$)	C ($K_i=9,5 \text{ mM}$)
AMP	C ($K_i=1,8 \text{ mM}$)	C ($K_i=4,8 \text{ mM}$)

* Competitiva. Tampón glicina-NaOH 50 mM, pH 10.

Discusión

El conjunto de los resultados obtenidos a pH 10, por aplicación del método de inhibición por producto, concuerdan básicamente según las predicciones teóricas de CLELAND (3), con un mecanismo secuencial ordenado bi-bi, en el cual la adición del par L-malato- NAD^+ sigue un orden definido, de igual forma que la liberación de los productos de la reacción. Por otra parte, en un mecanismo secuencial ordenado, el primer sustrato adicionado es inhibido competitivamente por su propio producto de reacción. De los resultados descritos se deduce que dicha competencia se manifiesta tan sólo entre los coenzimas NAD^+ y NADH , lo que implica que el coenzima es el primer sustrato que interacciona con el enzima en el ciclo catalítico; por tanto, la naturaleza del complejo binario formado en este mecanismo es E-coenzima.

El modelo propuesto implica, además, la existencia de tres centros esenciales para la actividad enzimática; el oxalace-

la concentración de NAD^+ es constante y saturante. En este caso es preciso aumentar la concentración de NADH para que se observe inhibición apreciable. El hecho de que el NADH , en estas condiciones, no pueda fijarse a la forma E y el tipo de inhibición respecto al L-malato sea no competitivo, está de acuerdo con la formación de los complejos «dead-end» $\text{E-NAD}^+\text{-NADH}$ y E-NADH-NADH , que sólo tienen significación cinética en estas condiciones.

La acción que el ATP, el ADP y el AMP ejercen sobre la malatodeshidrogenasa a pH 10, utilizando L-malato y NAD^+ como sustratos, se justifica plenamente con el esquema propuesto. Los resultados obtenidos indican que la inhibición por los mencionados nucleótidos transcurre por formación de los complejos abortivos E-nucleótido (responsable de la inhibición competitiva respecto al NAD^+) y $\text{E-NAD}^+\text{-nucleótido}$ (que justifica el carácter competitivo respecto al L-malato). Estos resultados están de acuerdo con los deducidos por otros autores (11) para el enzima de corazón de cerdo, operando con OAA y NADH como sustratos. El hecho de que los citados nucleótidos puedan fijarse también al centro del L-malato, con formación del complejo $\text{E-NAD}^+\text{-nucleótido}$, concuerda con el resultado descrito anteriormente de que el NAD^+ , cuando inhibe al enzima por exceso de sustrato, se adiciona al centro del L-malato.

Los valores muy similares de las constantes de inhibición para estos nucleótidos, permiten concluir que el número de grupos fosfato que aporta cada molécula de inhibidor no influye significativamente sobre la actividad enzimática.

Resumen

Se establece el mecanismo cinético de la malatodeshidrogenasa mitocondrial de hígado de pollo a partir de las velocidades iniciales

y de la inhibición por los productos de la reacción. Los resultados obtenidos en la reducción del NAD^+ (pH 10), permiten la formulación de un mecanismo secuencial ordenado bi-bi, en el que el coenzima es el primer sustrato que se adiciona al enzima.

La inhibición del enzima por los productos de la reacción y por el exceso de los propios sustratos pone de manifiesto la formación de los complejos abortivos E-oxalacetato ; E-L-malato ; $\text{E-NAD}^+\text{-oxalacetato}$; $\text{E-NAD}^+\text{-NADH}$; E-NADH-NADH y $\text{E-NAD}^+\text{-NAD}^+$, cuya significación cinética se puede justificar en unas condiciones experimentales definidas.

La inhibición producida por el ATP, el ADP y el AMP, en la reducción del NAD^+ a pH 10, está de acuerdo con el mecanismo propuesto y transcurre por formación de los complejos inactivos E-nucleótido y $\text{E-NAD}^+\text{-nucleótido}$.

Bibliografía

1. BARÓ, J., CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 241-248, 1974.
2. CASSMAN, M. y ENGLAND, S.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 793-799, 1966.
3. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104-137, 1963.
4. COOMBS, J., BALDRY, C. W. y BUCKE, C.: *Planta*, **110**, 109-120, 1973.
5. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706-1723, 1957.
6. FRIEDEN, C. y FERNÁNDEZ-SOUSA, J.: *Biol. Chem.*, **250**, 2106-2113, 1975.
7. HARADA, K. y WOLFE, R. G.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4131-4137, 1968.
8. HEYDE, E. y AINSWORTH, S.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2413-2423, 1968.
9. HEGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111-120, 1952.
10. LOWRY, O. M., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
11. OZA, N. B. y SMORE, J. D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 360-365, 1973.
12. RAVAL, D. N. y WOLFE, R. G.: *Biochemistry*, **1**, 1112-1117, 1962.
13. SANWALL, B. D.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1831-1837, 1969.
14. SILVERSTEIN, E. y SULEBELE, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 297-304, 1969.

