

ESPECIFICIDAD PARA EL COENZIMA DE LA DIACETILO REDUCTASA DE HIGADO DE BOVIDO

Por P. López Lorenzo,
R. Martín,
L. Herrero
y J. Burgos

INTRODUCCION

Las preparaciones de diacetilo reductasa de hígado de bóvido parcialmente purificadas por extracción acetónica, precipitación fraccionada con acetona, tratamiento con gel de fosfato cálcico y cromatografía en DEAE-cellulosa, no utilizan la acetoína y parecen ser muy específicas para el diacetilo, pero aceptan como substrato reductor el NADPH además del NADH (BURGOS y MARTÍN, 1972); contienen, por tanto, una diacetilo reductasa distinta de la que figura en la Clasificación de la International Union of Biochemistry, que sólo utilizan el NADH (acetoína: NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.5). En este trabajo se da cuenta de las experiencias efectuadas para comprobar si esta falta de especificidad para el coenzima es real o debida a la presencia en las citadas preparaciones de dos especies enzimáticas diferentes, una ligada al NADH y otra al NADPH.

MATERIAL Y METODOS

El diacetilo, la NN'-metilenbisacrilamida y el NNN'-tetrametilaminoetano (TEMED) fueron obtenidos de la BDH; la acrilamida, el Tris-hidroximetilaminometano, la glicocola, el fosfato bisódico y el monopotásico, de Merck; el NADH y el NADPH de Boehringer; el metasulfato de fenazina de Calbiochem, el nitroazul de tetrazolio de Sigma y el Sephadex G-75 de Pharmacia.

Las preparaciones enzimáticas se obtuvieron por el procedimiento descrito por BURGOS y MARTÍN (1972); salvo cuando se indica lo contrario, se utilizaron liofilizados de la fracción resultante de precipitar con acetona (entre 0,9 y 1,5 vols./vol. de medio) extractos acuosos 1/5 de cakes acetónicos de hígado de ternera.

Para las cromatografías en Sephadex G-75 se empleó una columna de 1,5 cms de diámetro interno, con una altura del lecho de gel de 50 cms y una presión de trabajo de 15 cms de eluyente.

Las determinaciones de actividad diacetilo reductasa se efectuaron por el sistema descrito por MARTÍN y BURGOS (1970), substituyendo el NADH por NADPH cuando así se indica.

Las electroforesis de disco en geles de acrilamida con tampón Tris-glicocola de pH 8,5 se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por DÍEZ y colaboradores (1974). Las electroforesis en tampón fosfato bisódico - monopotásico 0,05 M de pH 7,8 se efectuaron del mismo modo excepto que el diámetro de los tubos fue 0,6 cms, se aplicó un amperaje de 10 m A por tubo y la concentración de NADH o NADPH en el medio de incubación para el revelado de la actividad se redujo a 1,5 m M.

RESULTADOS

Perfiles de pH

La diacetilo-reductasa NADH-dependiente de hígado de bóvido presenta un perfil de pH muy característico, con un máximo en torno a pH 6 y un segundo pico, menos manifiesto, hacia pH 6,8 (BURGOS y MARTÍN, 1972). El mismo tipo de perfil se obtuvo (Fig. 1) al representar los resultados de los análisis a diferentes pHs de la actividad con NADPH.

Determinaciones de la velocidad de reacción con mezclas equimolares de los dos coenzimas

Una mezcla de dos enzimas distintos, uno de los cuales utilice sólo NADH y el otro NADPH, dará, en presencia de ambos, una velocidad inicial igual a la suma de las velocidades logradas con cada uno de ellos por separado, siempre que no existan efectos de activación o inhibición por el coenzima no utilizado. Por el contrario, al actuar uno o más isoenzimas que acepten tanto el NADH como el NADPH sobre una mezcla equimolar de los dos piridín - nucleótidos, debe resultar una actividad intermedia entre las obtenidas en los ensayos por separado a la concentración de cada uno de los coenzimas en la mezcla (véase DIXON y WEBB, 1964).

Las determinaciones de diacetilo reductasa dieron los siguientes resulta-

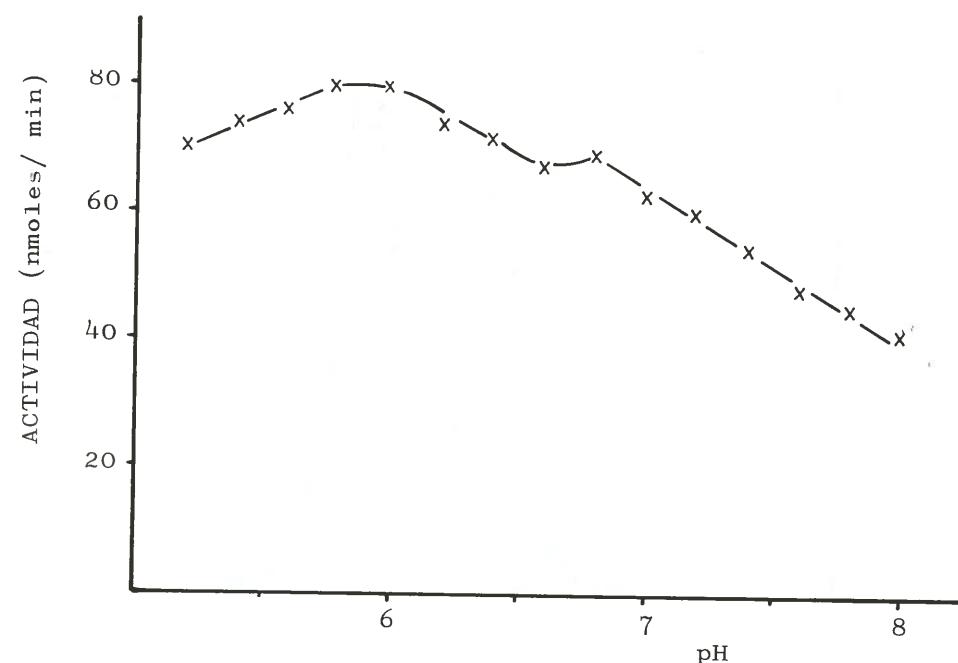


Fig. 1.-Perfil de pH de la actividad diacetilo reductasa NADPH-dependiente.

dos (media de cuatro determinaciones a una concentración de diacetilo 4 m M): (a) con NADH 0,16 m M, 53,6 ($\pm 1,4$); (b) con NADPH 0,16 m M, 124,8 ($\pm 3,9$); (c) con NADH 0,16 m M más NADPH 0,16 m M, 98,4 ($\pm 2,3$).

Perfiles de elución en Sephadex G-75

BURGOS y MARTÍN (1972) han observado que al chromatografiar en Sephadex las preparaciones de diacetilo reductasa de hígado de bóvido purificadas por precipitación fraccionada con acetona, la actividad se eluye en dos bandas correspondientes a pesos moleculares de aproximadamente 26.000 y 76.000. Nuestras experiencias demuestran que ambas bandas son activas tanto con NADH como con NADPH. En la Fig. 2 se representan los resultados obtenidos en las determinaciones de diacetilo reductasa NADH y NADPH - dependientes en el eluato de una cromatografía en Sephadex G-75 desarrollada con tampón fosfato bisódico - monopotásico 0,1 M de pH 6,3; puede observarse que las dos actividades presentan un perfil con dos picos, situado el primero en torno a 1,05 volúmenes vacíos y el segundo hacia 1,5. Este experimento se ha repetido utilizando para la elución tampones fosfato de pH 6,3 y molaridad 0,5, 0,25 y 0,025 M, en los tres casos con el resultado ya citado.

Las determinaciones de actividades NADH y NADPH-dependientes a distintos pHs con muestras de cada una de las bandas dan nuevamente, y en todos los casos, un óptimo en la zona de pH 6 y un pico secundario hacia 6,8

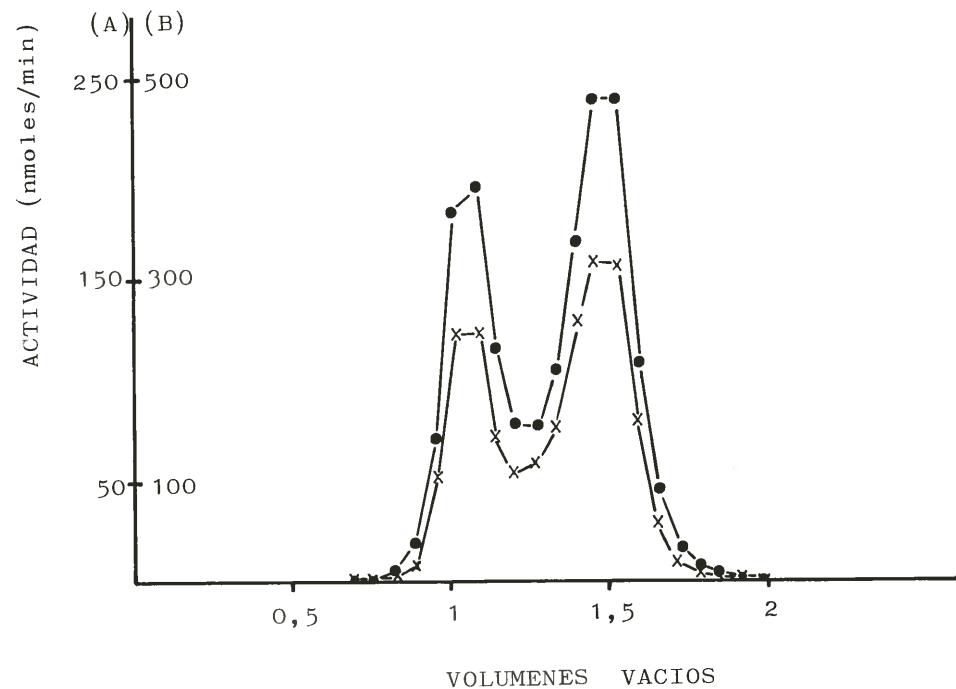


Fig. 2.-Perfiles de elución en Sephadex G-75. (X-X), escala A: actividad NADH-dependiente. (●-●), escala B: actividad NADPH - dependiente.

(Fig. 3). El perfil de actividad con NADPH corresponde a la banda de migración rápida difiere algo del obtenido con NADH, posiblemente por no ser igual el grado de saturación con los substratos; sobre todo, el pico a pH 6,8 resulta menos manifiesto, pero la elevación observada a ese pH y la tendencia del resto de los puntos experimentales dejan muy pocas dudas respecto a su existencia.

Por otra parte, las pruebas con mezclas equimolares de NADH y NADPH dieron, como media de cuatro determinaciones a concentración 4 m M de diacetilo, los valores siguientes: (a) banda de migración rápida, 47 ($\pm 1,6$) con NADH 0,16 m M, 129,6 ($\pm 3,5$) con NADPH 0,16 m M y 118,3 ($\pm 3,3$) con 0,16 m M de cada uno de los coenzimas; (b) banda de migración lenta, 46,1 ($\pm 1,7$) con NADH 0,16 m M, 108,4 ($\pm 2,6$) con NADPH a la misma concentración y 97,1 ($\pm 1,9$) con NADH 0,16 m M y NADPH 0,16 m M.

Electroforesis en gel de acrilamida

Un extracto acuoso de las preparaciones purificadas por precipitación fraccionada con acetona fue sometido a electroforesis en gel de acrilamida con

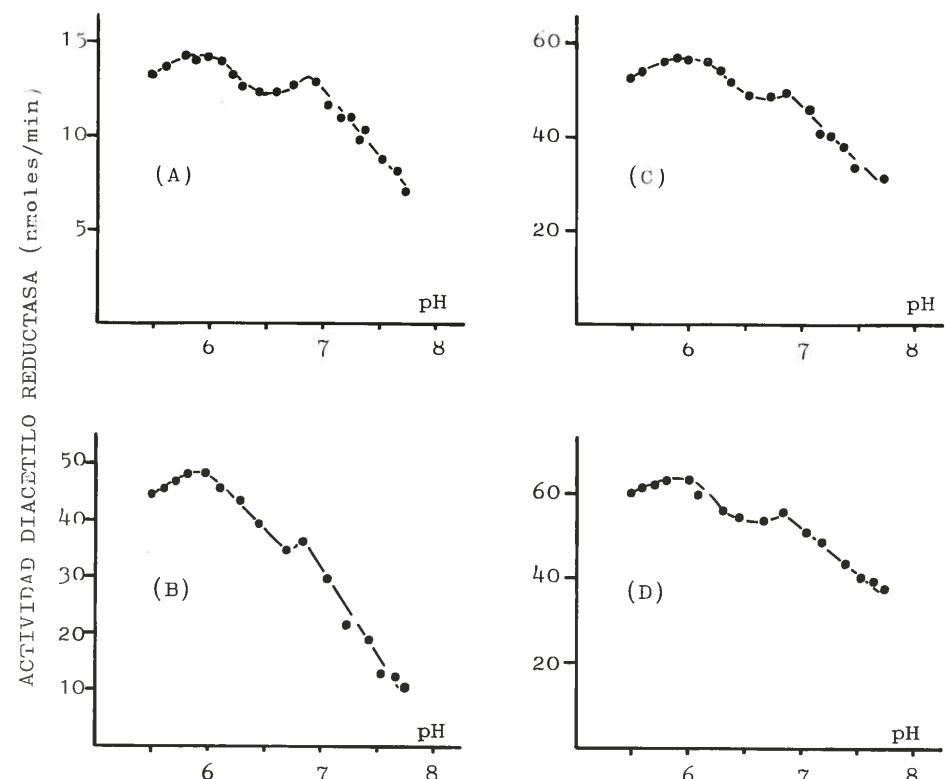


Fig. 3.-Perfiles de pH de las bandas de migración rápida y de migración lenta en Sephadex G-75; (A) banda de migración rápida, actividad medida con NADH; (B) id., con NADPH; (C) banda de migración lenta, con NADH; (D) id., con NADPH.

tampón Tris-glicocola de pH 8,5, con los resultados que se muestran en la Fig. 4: los geles teñidos para diacetilo reductasa ligada al NADPH reproducen exactamente a los revelados para actividad con NADH. Aunque a la concentración de acrilamida y bisacrilamida utilizada hay que esperar que se acusen efectos de tamizado molecular para proteínas del tamaño de las aquí estudiadas, en ambos casos sólo aparece una banda, en vez de, al menos, dos como era previsible por los resultados de las cromatografías en Sephadex; ello podría ser debido, entre otras posibilidades, a que las diferencias en peso molecular se compensen con diferencias de carga neta obrando en sentido opuesto, a que en las condiciones de trabajo se inactive uno de los isoenzimas o se produzcan cambios en el estado de asociación si se tratase de un monómero y un trímero como sugieren BURGOS y MARTÍN (1972), o a que el punto isoeléctrico de uno de ellos sea más alto que el pH del tampón de electroforesis, en cuyo caso migraría hacia el polo opuesto. Esto último parece poco probable, puesto que en experimentos semejantes llevados a cabo en tampón fosfato de pH 7,8

DISCUSION

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la actividad diacetilo reductasa con NADPH (a) presenta el mismo perfil de pH, con un máximo hacia pH 6 y un pico secundario a 6,8 que la NADH-dependiente; (b) es superior a la que se obtiene con NADH a igual concentración y con mezclas equimolares de NADH y NADPH; (c) migra electroforéticamente junto a la actividad ligada al NADH; y (d) se eluye en las cromatografías en Sephadex en dos bandas cuyos máximos coinciden con los que se observan al analizar la actividad con NADH, cuyos perfiles de pH con uno u otro coenzima muestran nuevamente la existencia de un óptimo en torno a pH 6 y un pico menos acusado hacia 6,8 y en las que las determinaciones de actividad con mezclas equimolares dan también resultados entre los que corresponden a los análisis por separado con NADPH y con NADH. Ninguna de estas pruebas es, por sí sola, concluyente, pero en conjunto demuestran que la diacetilo reductasa de hígado de bóvido acepta los dos piridín-nucleótidos.

A medida que van siendo aportados nuevos datos, el problema de la clasificación de las diacetilo reductasas resulta más complejo. Hasta el momento parecen existir por lo menos tres: Una que acepta el NADH y el NADPH, descrita inicialmente por DÍEZ y colaboradores (1974) en preparaciones de hígado de paloma y que se demuestra aquí, junto con otros resultados publicados por BURGOS y MARTÍN (1972), ser también la existente en las de hígado de ternera; este enzima no utiliza la acetoína, las monocetonas, los cetoácidos ni las dicetonas no vecinales y, hasta el momento, no se le conoce otro substrato que el diacetilo. Otra, NADPH-dependiente, que ha sido descrita en *Escherichia coli* por SILBER y colaboradores (1974) y acepta sólo alfa-dicarbonilos no cargados, del tipo de dicetonas vecinales y ésteres de alfa-cetoácidos, lo que hace suponer que su substrato específico en condiciones biológicas debe ser el diacetilo. Y una tercera, descubierta en principio por STRECKER y HARARY (1954) en *Staphylococcus aureus* y confirmada luego por otros autores en diversos microorganismos, que parece utilizar sólo el NAD; ésta es la única diacetilo reductasa incluida en la Clasificación de la International Union of Biochemistry (1972), pero, en opinión de los autores, resulta la más dudosa en cuanto a su especificidad. Por otra parte, el producto resultante de la reducción del diacetilo, la acetoína, tiene un átomo de carbono asimétrico y presenta por tanto dos estereoisómeros por lo que, como en los pocos casos en que se han obtenido preparaciones suficientemente puras de diacetilo reductasa no se ha comprobado su estereoespecificidad, la situación podría complicarse aún más.

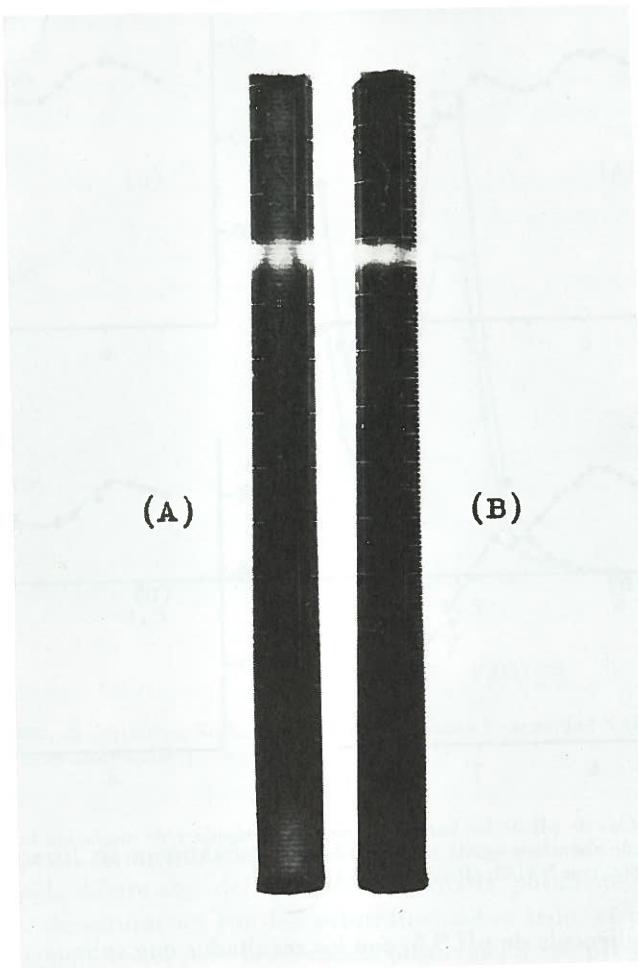


Fig. 4.-Electroforesis en gel de acrilamida de una muestra purificada por precipitación con acetona (aproximadamente 1 mg de proteína) con tampón Tris-glicocola 0,05 M, pH 8,5. La carrera se llevó a cabo a 3 m A por tubo (0,9 cms de diámetro) durante el tiempo necesario para que el patrón de azul de bromofenol migrase 12 cm (unas 6 horas). Sentido de migración, de negativo a positivo; origen en la parte superior. (A) gel teñido para actividad NADH-dependiente; (B) id. NADPH-dependiente.

aparecen dos bandas en los geles teñidos para actividad NADH-dependiente y otras dos en los revelados con NADPH. Por razones no suficientemente aclaradas, la tinción de la banda más rápida en las electroforesis en fosfato resulta siempre defectuosa, tanto con NADH como con NADPH, pero permite demostrar que no existen diferencias significativas al efectuar el revelado con uno u otro coenzima: sobre 10,5 cms recorridos por el indicador de azul de bromofenol, el centro de las bandas está situado, en ambos casos, a 1,55 cms y 2,57 cms.

RESUMEN

Los perfiles de elución en Sephadex G-75, las pruebas de migración electroforética, los perfiles de pH y las determinaciones de actividad con mezclas equimolares de NADH y NADPH demuestran que la diacetilo reductasa de hígado de bóvido acepta ambos coenzimas; en consecuencia, es diferente de la incluida en la Clasificación Internacional de Enzimas de la I.U.B. (1972), que debe ser modificada en este punto.

RÉSUMÉ

Les profils d'élution dans du Sephadex G-75, les preuves de migration électrophorétiques, les profils de pH et les déterminations d'activité avec des mélanges équimolaires de NADH et NADPH démontrent que la diacétyl-réductase de foie de bovin accepte les deux coenzymes et, par conséquent, qu'elle est différente de celle qui a été inclue dans la Classification Internationale d'Enzymes de la I.U.B. (1972), laquelle doit être modifiée sur ce point.

SUMMARY

Elution profiles on Sephadex G-75, electrophoretic migration on polyacrylamide gels and activity versus equimolar mixtures of NADH and NADPH show that beef liver diacetyl reductase activity with both pyridine nucleotides are due to the same enzymatic species. Beef liver diacetyl reductase is therefore different from the one described in the Enzyme Nomenclature of the I.U.P.A.C. and I.U.B.

BIBLIOGRAFIA

BURGOS, J. y MARTÍN. (1972).-*Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 261.
DÍEZ, V., BURGOS, J. y MARTÍN, R. (1974).-*Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 253.
DIXON, M. y WEBB, E. C. (1964).-*Enzymes*. Longmans, London, 2.^a ed. pg. 84-90 y 203.
MARTÍN, R. y BURGOS, J. (1970).-*Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 356.
SILBER, P., CHUNG, H., GARGIULO, P. y SCHULZ, H. (1974).-*J. Bacteriol.*, **118**, 919.
STRECKER, H. J. y HARARY, I. (1954).-*J. Biol. Chem.*, **211**, 263.