

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA

Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

OXIDAÇÃO DE NADH POR LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO.
I — PREPARAÇÃO E ATIVIDADE OXIDATIVA DE
SUBPARTÍCULAS CELULARES *

(OXIDATION OF NADH BY BAKER'S YEAST CELLS. I — RESPIRATORY ACTIVITY OF SUB-CELLULAR PARTICLES)

METRY BACILA
Prof. Catedrático

TOMOKO HIGUCHI **
Prof. Assistente Doutor

Oxidação de piridinonucleotídeos reduzidos tem sido descrita para tecidos animais (HORECKER, 1950; EDELHOCH e col., 1962; MAHLER, 1952 e GARFINKEL, 1957), bactérias (BRODIE, 1952) e leveduras (HAAS e col., 1940). Nos casos estudados, NADH ou NADPH são reconhecidamente oxidados por citocromo c-reductases. Diversos trabalhos foram também realizados, sobre a oxidação de NADPH por diaforases de preparação particulada ou de extratos crus de grande número de tecidos animais e de organismos. NADH-citocromo-c-reductase foi purificada a partir de músculo cardíaco de suínos (EDELHOCH e col., 1952 e MAHLER, 1952), de microsomas hepáticos (GARFINKEL, 1957) e de *Escherichia coli* (BRODIE, 1952), enquanto que NADPH citocromo-c-reductase foi purificada à partir de fígado (HORECKER, 1950) e de levedura (HAAS, 1940). No caso das diaforases, muito bem purificadas que foram, a partir de coração de suínos (MAHLER, 1955), podem elas interagir com uma variedade de corantes, sendo, porém, completamente inertes com citocromo c.

Em experimentos anteriores, foi demonstrado por BACILA, 1965, que partículas respiratórias isoladas correspondentes as frações mitocondriais de levedura de panificação, são capazes de oxidar NADH diretamente, propriedade essa inexistente nas preparações de mitocôndrias animais. Foi demonstrado, também, que a atividade respiratória da mitocôndria de levedura é controlada por concentrações limites de NADH.

* Com o auxílio da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior.

** Cadeira de Microbiologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo.

No presente trabalho, são relatadas experiências, apresentando diferentes aspectos desse problema, inclusive dados preliminares relativos à natureza bioquímica da oxidação de NADH pela fração mitocondrial de levedura.

MATERIAL E MÉTODOS

Levedura de panificação da marca Fleishman foi usada para as experiências aqui relatadas. Porções de 50 g de levedura eram suspensas em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5, e lavadas duas vezes por centrifugação em centrífuga International PR2, no mesmo tampão e conservadas por 12 horas em câmara fria.

A preparação de partículas subcelulares era feita a partir de células tratadas como se descreveu acima. A porção de células de cada tubo de centrífuga era transferida para um almofariz e adicionadas de um volume equivalente de pérolas de vidro ("glass beads") n.º 12 (Companhia 3M, Campinas, São Paulo). A trituração era levada a efeito a frio até que toda a massa se tornasse umedecida e pastosa e o pH baixasse até cerca de 6,0. Cerca de 1 volume (v/v) de líquido de extração (manitol, 0,21 M; Tris (hidroximetil amino metano), 0,01 M; EDTA (etilenodiamino tetracetato de sódio, 0,001 M); pH final 7,5) era então adicionado ao material triturado e tudo bem misturado. A suspensão total era centrifugada por 10 minutos a cerca de 1 000 XG em centrífuga International, a 0°C para eliminação de células intactas e das pérolas de vidro. O sobrenadante era, então, coletado e centrifugado a cerca de 10.000 XG por 15 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento obtido, considerado como "fração mitocondrial" era, então, coletado e lavado por duas vezes mais, e usado como fonte de enzimas. Em algumas experiências, o sobrenadante de 10.000 XG foi centrifugado a 105.000 XG. A fração assim obtida era considerada como "fração microsossomial".

A oxidação de NADH foi determinada pela variação na densidade óptica a 340 m μ em espectrofotômetro Beckman modelo DU, de um sistema contendo 3,0 ml de meio de extração, 30 μ l de solução de NADH (10 μ moles/ml) e enzima.

O conteúdo de proteína e de ácido nucléico foi estimado por absorção de luz ultravioleta segundo o método de WARBURG e CHRISTIAN, 1941. Densidades ópticas eram tomadas a 280 e 260 m μ , e o conteúdo de proteína determinado segundo as relações de densidade óptica a 280 e 260 m μ correspondendo a constante F, quando então:

$$F \times D.O. 280 / \text{aliquota} = \text{mg proteína por ml}$$

A relação D.O. 280/D.O. 260 é equivalente ao conteúdo em ácido nucléico.

A medida respirométrica da fração mitocondrial com NADH foi procedida pela técnica convencional de Warburg.

Micrografias eletrônicas das frações obtidas por centrifugação fracionada foram tomadas segundo a técnica usual ou seja, fixação com ácido ósmico e subtosan seguido de desidratação pelo álcool.

Os reativos usados foram os seguintes: Manitol E. Merck; Tris (hidroximetil) aminometano, E. Merck; EDTA (etilenodiaminotetracetato de sódio) Baker's; NADH, dihidroxi- β -difosfopiridino nucleotídeo, sal dissódico, Sigma Chemical Company; Citocromo c, Nutritional Biochemicals Corporation.

RESULTADOS

1. *Distribuição da atividade oxidativa de NADH pelas frações subcelulares de levedura*

A atividade exercida pelas diferentes frações subcelulares da levedura quanto à oxidação do NADH foi estudada na experiência da fig. 1. Verifica-se que a atividade oxidativa de NADH se distribui pelas três frações — homogenado, fração mitocondrial e fração microssomial enquanto que o sobrenadante final é totalmente inativo. A atividade específica maior é a da fração mitocondrial.

2. *Efeito da concentração de proteínas sobre a velocidade de oxidação de NADH*

O efeito da concentração de proteína da fração mitocondrial sobre a velocidade da oxidação de NADH foi estudado na experiência da fig. 2.

3. *Especificidade para NADH da atividade oxidativa da "fração mitocondrial" de leveduras*

A fim de determinar a especificidade da atividade enzimática para NADH, a seguinte experiência foi levada a efeito. A fração mitocondrial suspensa em líquido de extração foi adicionada de sulfato de amônio até a concentração final de 0,3 de saturação e o sobrenadante obtido por centrifugação. A atividade oxidante da fração mitocondrial foi conservada no sobrenadante e foi utilizada para a experiência da fig. 3. Verifica-se por ela que a adição de NADPH não influi sobre a atividade enzimática, por onde se demonstra que tal atividade é ligada de modo específico à oxidação de NADH.

4. *Efeito da concentração de NADH na atividade respiratória da fração mitocondrial*

A demonstração de que quantidades limites de NADH controlam a atividade respiratória da fração mitocondrial de levedura está representada pela experiência da fig. 4.

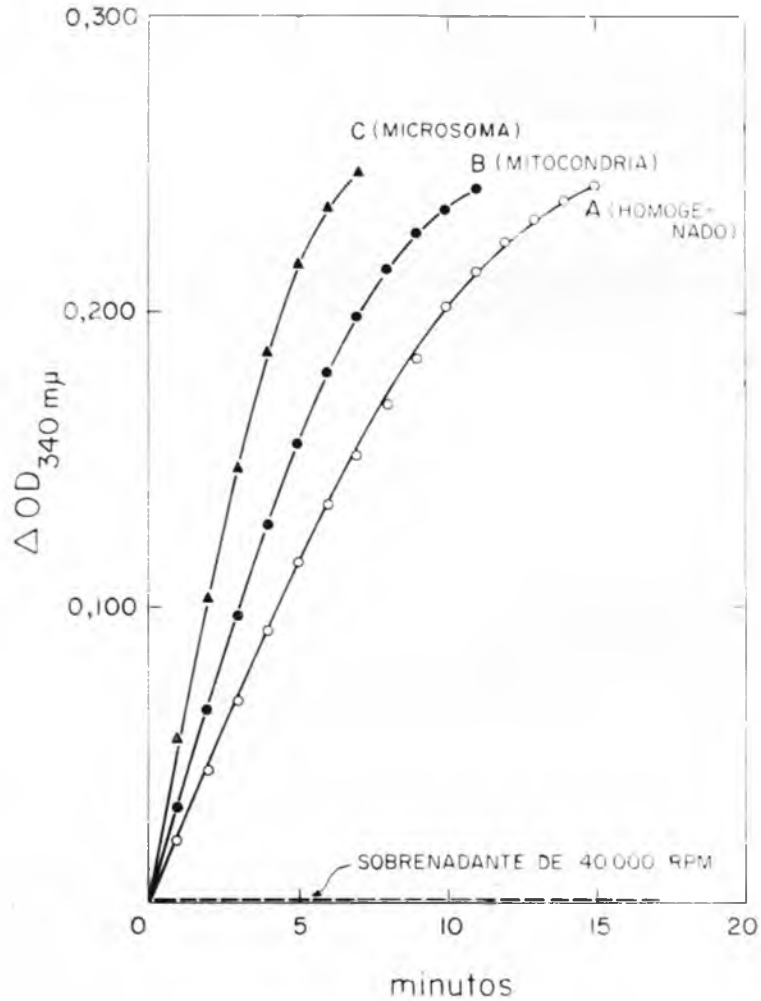


Fig. 1 — Distribuição da NADH «oxidase» entre as frações subcelulares de levedura de panificação. O sistema contém 1 ml de meio de extração (manitol 0,21 M, Tris, 0,01 M, EDTA, 0,001 M, pH 7,48), 5 μ l de NADH (10 μ moles por ml). A atividade específica de cada fração foi a seguinte: Homogenado, 0,27; fração mitocondrial, 1,29; fração microsomial, 0,28.

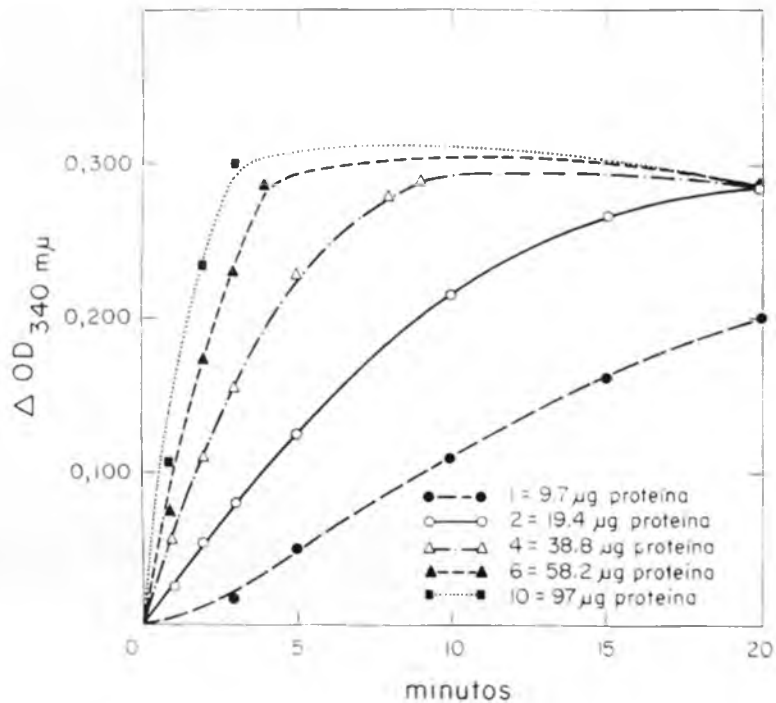


Fig. 2 — Efeito da concentração de proteína da fração mitocondrial sobre a velocidade de oxidação de NADH. Sistema: 1,0 ml de meio de extração, 5 μl de solução de NADH contendo 10 μ moles por ml e 1, 2, 4, 6, ou 10 μl de suspensão mitocondrial contendo 9,7 mg proteína/ml. Adição de NADH procedida no "tempo zero".

TABELA I — Efeito da concentração de NADH na velocidade respiratória de fração mitocondrial de levedura. Sistema corresponde ao da Fig. 4.

	A	B	C	D *	E
	NADH (μ moles)	μl O ₂ (50 min.)	μl O ₂ aos 5 min.		μl O ₂ g proteína
1	—	8,0	3,3	—	1,34
2	0,8	18,3	3,4	0,1	3,08
3	1,5	27,0	6,4	3,1	4,54
4	2,0	34,2	10,9	7,6	5,76
5	4,0	89,78	40,2	36,9	15,12

* Dados da coluna D. Correspondem à diferença entre a atividade respiratória das frações que contém NADH e o da respiração endógena, aos 5 minutos da adição de substrato.

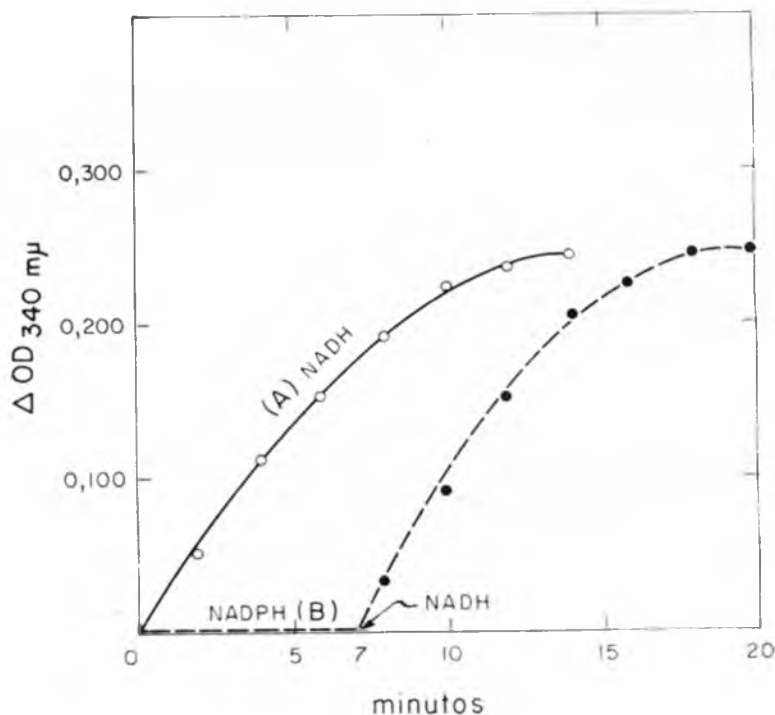


Fig. 3 — Oxidação de NADH e de NADPH pelo sobrenadante de 0,3 de saturação de sulfato de amônio. O sistema contém: 1 ml de meio de extração; 20 μ l do sobrenadante contendo 19,04 μ g de proteína final; e 5 μ l de NADPH contendo 10 μ moles por ml. Em (B), o NADPH foi adicionado, de início; sete minutos depois, 5 μ l de solução de NADH foram adicionados ao sistema.

Verifica-se pelos resultados obtidos que há relação direta entre a concentração de NADH e a velocidade respiratória da fração mitocondrial da levedura (Tabela I).

A fig. 5 corresponde aos dados da Tabela I e mostram o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação ou das reações enzimáticas da fração mitocondrial que ocorrem em consequência da oxidação de NADH.

5. Microscopia eletrônica das frações celulares de levedura

A fim de determinar a correspondência da atividade bioquímica que está sendo estudada, micrografias eletrônicas foram obtidas a partir do homogenado, da "fração mitocondrial" e da "fração microsossomial" da levedura de panificação. As figuras 6 a 9 mostram os resultados obtidos, por onde se verifica que ocorre coincidência entre a fração que apresenta maior atividade especí-

fica com respeito à oxidação de NADH e a maior concentração de partículas mitocondriais.

6. *Distribuição da atividade de oxidação de NADH com relação à concentração de proteína e de ácidos nucléicos dos particulados*

A fim de estudar a distribuição da atividade relativa à oxidação de NADH na preparação de particulados subcelulares de levedura, homogenizados e sedimentos, êstes obtidos a 10.000, 15.000, 40.000 e 105.000 x g foram analisados por atividade de oxidação de NADH, para conteúdo de proteína e em ácidos nucléicos. A fig. 10 mostra o resultado obtido.

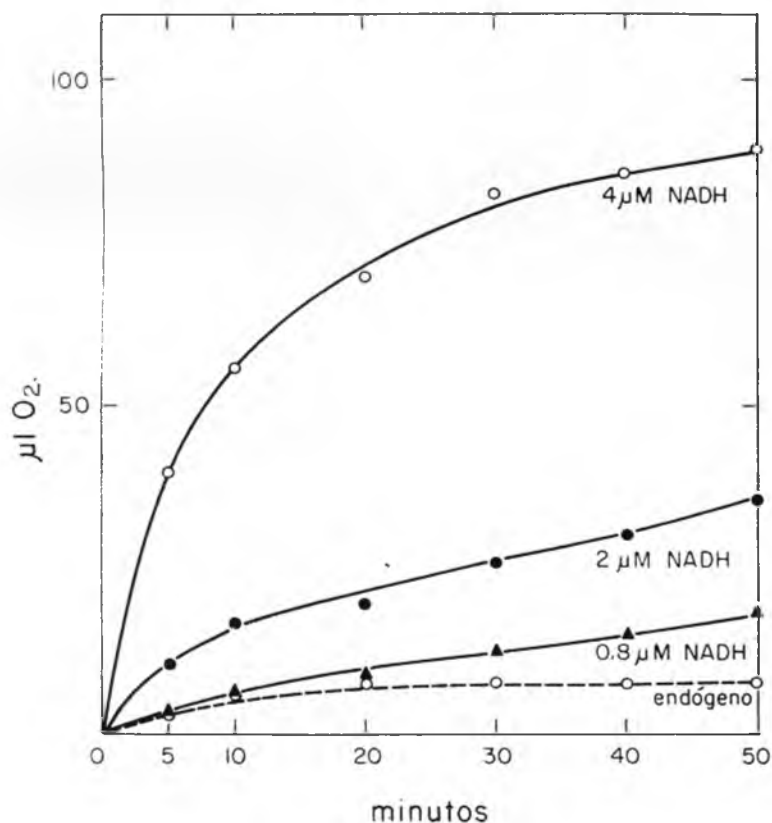


Fig. 4 — Efeito da concentração de NADH na atividade respiratória da fração mitocondrial de levedura de panificação. Sistema do endógeno: meio de extração 2,2 ml; KOH, 0,15 ml; suspensão de mitocôndria, 0,5 ml. No braço lateral de frascos subsequentes foram pipetados 0,08, 0,15, 0,2 e 0,4 ml de solução de NADH contendo 10 µ moles por ml. Temperatura, 30°C; 100 agitações por minuto. Proteína: 5.936 mg/ml.

DISCUSSÃO

A oxidação direta de NADH pela “fração mitocondrial” de levedura de panificação apresenta importantes implicações para a biologia dessa estrutura celular. Esse fato já é de relevo quanto à reação da triosefosfato desidrogenase onde se produz NADH extramitocondrial que, pelos dados apresentados no presente trabalho, pode ser diretamente oxidado pela fração particulada da célula. A regulação dos níveis de NADH/NAD da célula da levedura pode depender, assim, não só da etapa de desidrogenase alcoólica mas, também, da atividade das partículas celulares ora descritas, cuja velocidade se relaciona, entretanto, com a concentração de NADH (fig. 5).

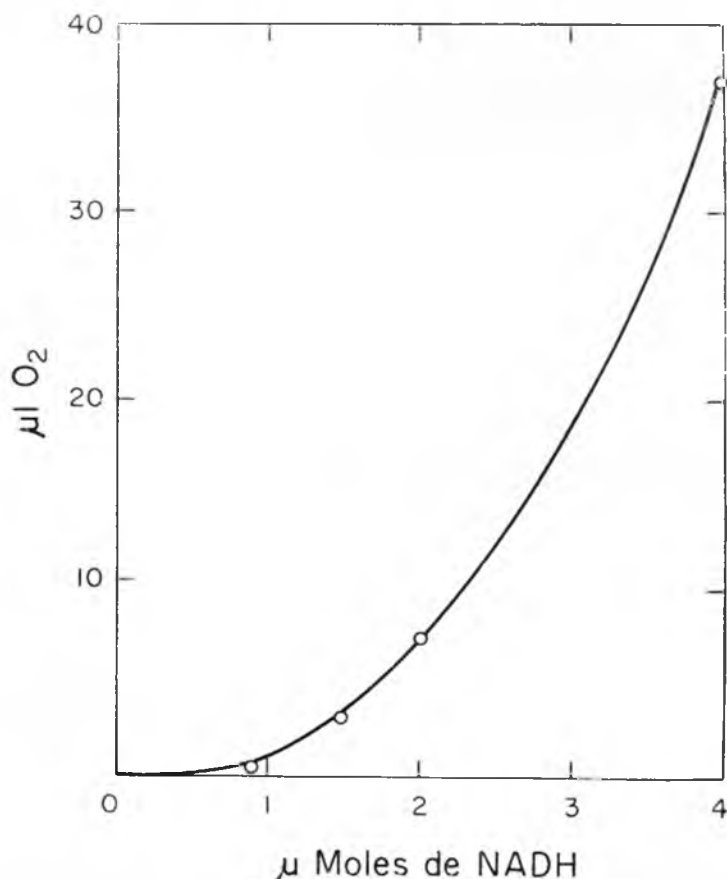


Fig. 5 — Efeito da concentração de NADH sobre a velocidade da respiração da fração mitocondrial de leveduras. Sistema corresponde ao da Fig. 4 e os dados verificados correspondem à atividade respiratória da fração mitocondrial ao 5 minutos da adição do substrato em diferentes concentrações.

A correlação entre a oxidação de NADH e a fração particulada da elvedura foi bem demonstrada no presente trabalho, onde se verifica que sobrenadante de 105.000 x g resultante da centrifugação fracionada é pouco ativo, enquanto que a atividade de oxidação se distribui entre a “fração mitocondrial” e a “fração microssomial”, com maior atividade específica para a primeira a ponto de que em experiências onde frações obtidas a diferentes forças centrífugas (Fig. 10) foram analisadas, a menor atividade enzimática é daquela que corresponde ao maior conteúdo em ácido nucléico e diz respeito ao sedimento coletado a 105.000 x g.



Fig. 6 — Micrografias eletrônicas do homogenado de levedura de panificação. Constata-se a presença de material heterogêneo onde se pode distinguir a presença de microssomas, de elementos aparentemente mitocondriais, além de grânulos não identificados. Aumento 20.000 X. Corresponde à fração de sobrenadante do centrifugado a 3.000 XG.

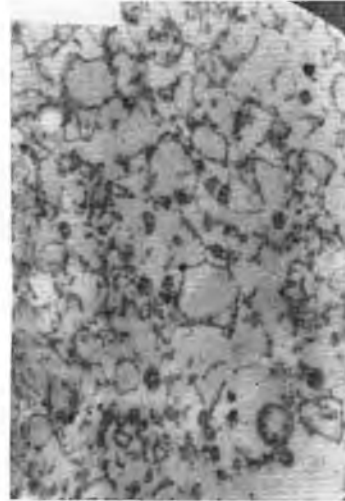


Fig. 7 — Micrografia eletrônica das frações sedimentadas a 10.000 XG. No campo estudado se encontram numerosos microssomas aglomerados formando uma rede onde se encontram grânulos mitocondriais esparsos. Não foi possível distinguir ribossomas na preparação. Aumento de 80.000 X.

No presente estado das investigações, é difícil atribuir a localização do sistema enzimático responsável por essa atividade à mitocôndria propriamente dita, se bem que essa possibilidade seja ainda a mais aceitável. A dúvida indicada resulta da análise das micrografias das figs. 6 a 9 onde se demonstra a presença de par-

ticulados com aparência tipicamente mitocondrial, com maior incidência na chamada fração mitocondrial, porém, sempre em estreita associação com numerosas formações microssomiais, onde se encontram grânulos mitocondriais esparsos. Dois fatos, porém, levam a atribuir a sua localização nos grânulos mitocondriais. O primeiro diz respeito à verificação de que quanto maior o conteúdo de ácidos nucléicos, menor a capacidade da preparação de oxidar NADH; enquanto que o segundo se refere ao fato de que em experiência de respirometria, onde é óbvia a utilização de oxigênio atmosférico implicando aí a participação dos sistemas mitocon-

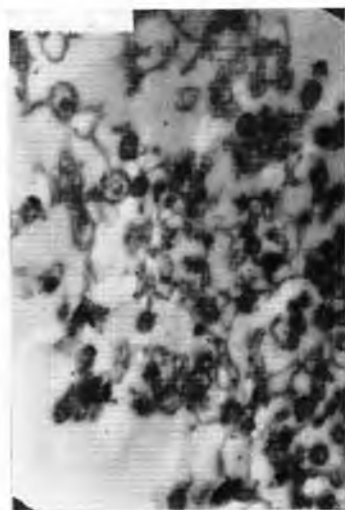


Fig. 8 — Micrografia eletrônica da fração sedimentada a 10.000 XG. No campo estudado distinguem-se numerosos grânulos com aparência mitocondrial entre membranas de microssomas, além da presença de elementos não identificados. Aumento de 80.000 X.

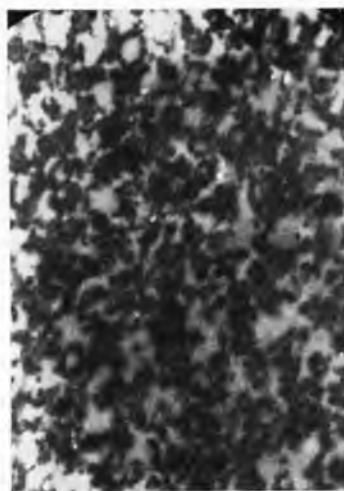


Fig. 9 — Micrografia eletrônica da «fração microssomial» (105.00 XG) da levedura de panificação.

driais de transporte de hidrogênio e de elétrons e de ativação do oxigênio, é possível analisar os efeitos da concentração do substrato, no caso NADH, sobre a velocidade do processo respiratório.

Aspecto importante do problema diz respeito à natureza da proteína enzimática que participa desse fenômeno. A purificação da referida enzima procedida por HIGUCHI, OCAMPOS e BACILA, (1967) demonstra que o sistema enzimático é solubilizado por precipitação com sulfato de amônio. Em concentração de sulfato de amônio correspondente a 0,3 de saturação há precipitação

de considerável quantidade de proteína inativa, permanecendo a proteína ativa no sobrenadante. Esta é parcialmente precipitada a 0,6 de saturação com sulfato de amônio quando se obtém proteína enzimática cuja atividade de oxidação de NADH não só é específica para esse substrato, como também se estimula pela adição ao sistema de reação de fração termoestável do sobrenadante ou pela adição de citocromo c.

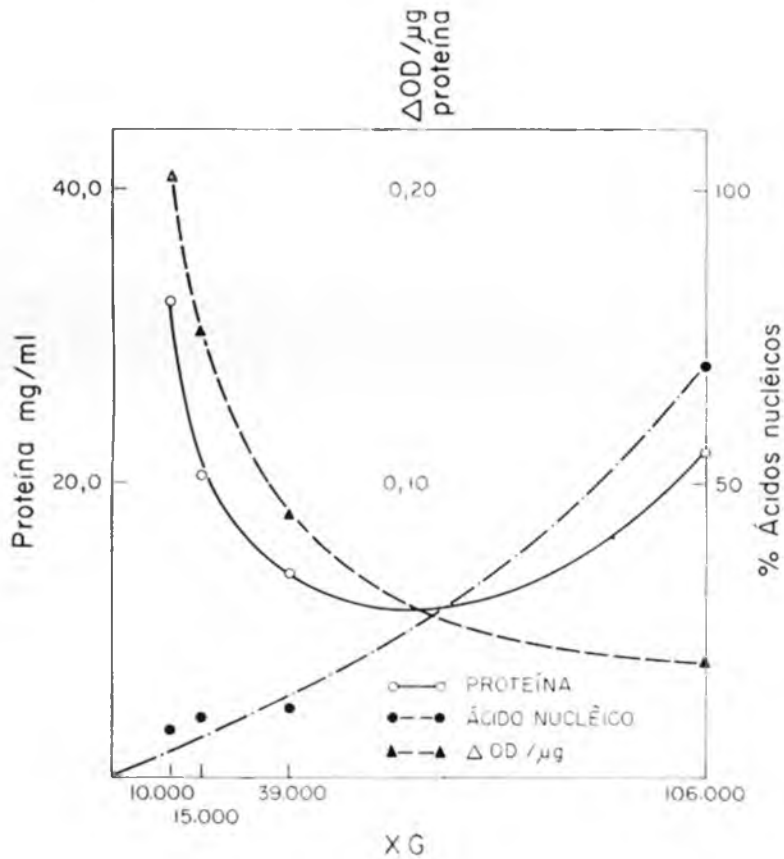


Fig. 10 — Conteúdo em proteína e ácidos nucleicos em relação à velocidade de oxidação de NADH em frações subcelulares de levedura de panificação.

Esse resultado faz admitir a possibilidade de que a enzima primariamente implicada nesse processo seja um NADH-citocromo c reductase. Diversos mecanismos de oxidação de piridinonucleotídeos foram já descritos para bactérias, levedura e tecidos animais. Entretanto, no que se refere à levedura, foi descrito por

HAAS, HORECKER e HOGNEES (1940) uma NADPH-citocromo c reductase, enquanto que a "antiga enzima amarela" (WARBURG, 1933 e 1938) capaz de ser reduzida por NADPH e NADH, na sua leucoforma, pode ser reoxidada pelo oxigênio molecular, mas não por citocromo c. No caso da preparação de MAHLER, SARKAR, VERNON e ALBERTY, 1952, foi verificado que a NADH-citocromo c reductase, purificada em alto grau, mostra atividade de diaforase. Atividade de diaforase, entretanto, em que NADH é oxidado na presença de diversos aceptores de hidrogênio, tais como corantes, entre outros, deve ser distinguida da atividade de piridinonucleotídeo reduzido citocromo c reductase, porque no caso das primeiras, citocromo c não atua como acceptor sendo a enzima, de fato, completamente inerte na sua presença. DEWAN e GREEN (1938) e CORRAN, GREEN e STRAUB (1939), relataram preparações de particulados contendo diaforase que interagiam com citocromo c. Esses resultados podem ser explicados, entretanto pela possível presença em tais partículas, de NADH-citocromo c-reductase, além da possibilidade da existência de citocromo c ligado às mesmas. JAYARAMAN, COTMAN e MAHLER (1966) associaram a existência de duas atividades enzimáticas em *Saccharomyces cerevisiae* ao sistema de oxidase de NADH, uma de NADH-citocromo c reductase e uma de citocromoxidase, as quais variariam em proporção constante durante o ciclo de repressão do metabolismo da levedura.

SUMÁRIO

São relatadas experiências de preparação de particulados de células de levedura de panificação com propriedade de oxidarem NADH. Foi verificado que essa atividade é vinculada à presença de grânulos mitocondriais que em micrografias eletrônicas aparecem associados à uma rede de membranas microssomiais. A velocidade de oxidação do NADH medida em base ao consumo de oxigênio molecular é proporcional à concentração do mesmo que também é específico, no processo, uma vez que NADPH não é oxidado.

SUMMARY

Experiments were carried out, in which NADH is directly oxidized by baker's yeast subcellular particles. It was shown by electronmicroscopy that such activity is linked to the mitochondrial granules which appear to be associated to a net of microssomal membranes. The rate of NADH oxidation measured as oxygen uptake is rate limited by NADH concentration. NADH is specific to this reaction, since the preparation is completely inactive in the presence of NADPH.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Dr. A. Brunner Jr., do Instituto Butantan pelo preparo de micrografias eletrônicas, bem como à Minnesota Manufatureira e Mercantil Ltda., pela concessão de "glass beads" usados no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAN, E. P. & ADLER, E. — 1940 — 20. The specificity of diaphorase (coenzyme factor) *Biochem. J.*, 34 (1): 119-127.
- ADLER, E.; von EULER, H.; GÜNTHER, G. & PLASS, R. — 1939 — Dehydrogenases and iodoacetic acid. *Skand. Arch. Physiol.*, 82: 61-78 cf. C. A. 33(3): 5423.
- BACILA, M. — 1965 — dados não publicados.
- BRODIE, A. F. — 1952 — A bacterial diphosphopyridine nucleotide linked cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.*, 199(2): 835-844.
- CORRAN, H. S.; DEWAN, J. G.; GORDON, A. H. & GREEN, D. E. — 1938 — CCXI. Xanthine oxidase and milk flavoprotein. *Biochem. J.*, 33: 1964.
- CORRAN, H. S.; GREEN, D. E. & STRAUB, F. B. — 1939 — c. On the catalytic function of heart flavoprotein. *Biochem. J.*, 33(1): 793-801.
- DEWAN, J. G. & GREEN, D. E. — 1938 — LXXXIII. Coenzyme factor. A. new oxidation catalyst. *Biochem. J.*, 32: 626.
- EDELHOCH, H.; HAYASHI, O. & TEPLY, L. J. — 1952 — The preparation and properties of a soluble diphosphopyridine nucleotide cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.*, 197(1): 97-104.
- Von EULER, H. & HELLSTRÖM, H. — 1938 — II. Enzymic hydrogen carriers in muscle. *Z. physiol. Chem.*, 252: 31-40; cf. C. A. 32: 2966.
- GARFINKEL, D. — 1957 — Preparation and Properties of a microsomal DPNH cytochrome *c* reductase. *Arch. Biochem.*, 71: 100.
- HASS, E.; HORECKER, B. L. & HOGNESS, T. R. — 1940 — The enzymatic reduction of cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.*, 136(1): 747-774.
- HIGUCHI, T.; OCAMPOS, D. & BACILA, M. — 1967 — Em preparação.
- HORECKER, B. L. — 1950 — Thiphosphopyridine nucleotide cytochrome *c* reductase in liver. *J. Biol. Chem.*, 183: 593.

- JAYARAMAN, J.; COTMAN, C. & MAHLER, H. R. — 1966 — Biochemical correlates of respiratory deficiency. VII. Glucose repression. *Arch. Bioch. Bioph.*, 116: 224.
- MAHLER, H. R.; SARKAR, N. K.; VERNON, L. P. & ALBERTY, H. R. — 1952 — Studies on diphosphopyridine nucleotide cytochrome *c* reductase. II. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 199(2): 585-597.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. — 1933 — The yellow enzyme and its functions. *Biochem. Z.*, 226: 377-411 — cf. *C. A.* 28(1): 794¹.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. — 1938 — Bemerkung über gelbe Ferment 1 — Spaltung des altur gelben Ferments. *Biochem. Z.*, 298: 368.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. — 1941 — Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, 310: 384.