

Caracterización de un inhibidor de la G6PDH

A. M. Rodríguez-Torres*, A. Villamarín, C. Carballal, M. D. Vázquez-Illán
y J. I. Ramos-Martínez

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 3 de febrero de 1986)

A. M. RODRIGUEZ-TORRES, A. VILLAMARIN, C. CARBALLAL, M. D. VAZQUEZ-ILLANEZ and J. I. RAMOS-MARTINEZ. *Characterization of a G6PDH Inhibitor*. Rev. esp. Fisiol., 43 (1), 7-12, 1987.

A strong inhibitor of G6PDH has been detected in rat liver homogenates. The inhibitor, isolated by ultrafiltration methods, proved to be very stable under incubation with trypsin and high temperatures. Gel-filtration through Sephadex G-75 showed it to have a molecular weight of 3,500 daltons, though perchloric acid treatment produced a light form of 900 daltons. Both forms of inhibitor act as competitive inhibitor with respect to G6P and exhibit non-competitive inhibition pattern with respect to NADP⁺. Physical and kinetic properties, and the increase of G6PDH activity at low NADP⁺ concentrations, in the presence of NADPH and inhibitor or palmitoyl-CoA, in relation to the G6PDH activity in presence of NADPH, lead to the identification of the low-molecular weight inhibitor as palmitoyl-CoA.

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Palmitoyl-CoA.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) (G6PDH) es la principal enzima reguladora de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato. Distintos autores (1, 9) demostraron que *in vitro*, cocientes NADPH/NADP⁺ próximos a 8 inhibían casi en su totalidad al enzima. Puesto que, *in vivo*, dicho cociente tiene un valor mucho más elevado, la ruta no debería ser operativa, extremo que no sucede.

EGGLESTON y KREBS (1) y RODRÍGUEZ-SEGADÉ *et al.* (7) encontraron que el glutatión oxidado a concentraciones fi-

siológicas, era capaz de revertir la inhibición inducida por el NADPH, para lo cual se requería la presencia de un cofactor polipeptídico altamente inestable, que fue aislado a partir de hígado de rata (6). También detectaron que filtrados obtenidos usando conos de ultrafiltración Amicon 224-CF-50A, procedentes de homogenados crudos de hígado de rata, contenían un inhibidor dializable de la G6PDH que anulaba el efecto indicado anteriormente, puesto que disminuía la inhibición del enzima por el NADPH a pequeñas concentraciones de NADP⁺ (elevados cocientes NADPH/NADP⁺).

En el presente trabajo se describe la caracterización de esta molécula.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Reactivos. — Todos los sustratos, coenzimas y enzimas fueron de Sigma; los productos de cromatografía, de Pharmacia Fine Chemicals (Suecia); y el resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Ensayo de la actividad enzimática. — La actividad G6PDH se determinó a 25°C, midiendo el incremento de absorbancia debido a la reducción del NADP⁺ a 340 nm. La mezcla de reacción contenía: tampón tris-ClH 50 mM, pH 7,5; Cl₂Mg 5 mM; G6P 1 mM; NADP⁺ 0,02 mM y G6PDH purificada en un volumen de 0,05 ml. El volumen final fue de 1 ml y el ensayo se inició mediante la adición de G6P.

Purificación de la G6PDH de hígado de rata. — La enzima fue purificada según el proceso descrito por HORI y SADO (2) que comprende precipitación fraccionada con sulfato amónico, cromatografías de cambio iónico sobre DEAE y CM-Sephadex y gel-filtración a través de Sephadex G-150. La única forma activa detectada presentó al final del proceso de purificación una actividad específica de 16 U.I./mg de proteína. La concentración proteica se valoró por el método de LOWRY *et al.* (4).

Métodos analíticos. — Muestras del inhibidor se mezclaron con 3 volúmenes de ácido perclórico (PCA). Posteriormente, el precipitado formado se eliminó por centrifugación a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante, neutralizado con bicarbonato sódico 5 M, fue usado como fuente de inhibidor.

El efecto de la tripsina sobre el inhibidor fue estudiado utilizando el método descrito por RODRÍGUEZ-SEGADE *et al.* (6). La acción de la fosfatasa alcalina sobre el inhibidor, con el fin de verificar un posible carácter de ester fosfórico, se rea-

lizó con el método de VAN SCHAFTINGEN *et al.* (10).

Resultados y Discusión

En un potter de vidrio-teflón se homogeneizaron hígados de ratas Wistar, alimentadas *ad libitum*, con 4 volúmenes de tampón tris-ClH 10 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM. El homogenado se centrifugó a 30.000 g durante 30 min (0-4°C). Se excluyó el precipitado, y el sobrenadante se concentró mediante una cámara de ultrafiltración Amicon dotada de una membrana Amicon PM-30. La adición de alícuotas del filtrado obtenido (0,05 ml) a mezclas de reacción de determinación de la actividad G6PDH, produjo una fuerte inhibición del enzima

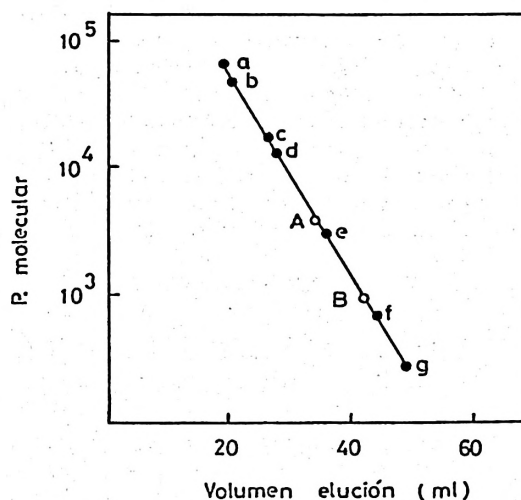


Fig. 1. Determinación del peso molecular del inhibidor de la G6PDH.

Se utilizaron columnas de Sephadex G-75 (30 × 1,2 cm), estabilizadas con tampón tris-ClH 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM y calibradas con seroalbúmina bovina (a), ovoalbúmina (b), mioglobina (c), citocromo (d), glucagón (e), glutatión oxidado (f) y DPN-L-alanina (g). A) Concentrado procedente de la membrana Millipore PSAC. B) Filtrado de la membrana Millipore PSAC después del tratamiento de (A) con ácido perclórico.

(74,8% de actividad residual), que se incrementó al concentrar nuevamente dicho filtrado con una membrana Millipore PSAC, que permite el paso exclusivamente de moléculas de menos de 1.000 daltones de peso molecular (52% de actividad residual). No se encontró efecto inhibidor apreciable cuando se añadieron 0,4 ml de filtrado de la segunda concentración.

Los resultados de los procesos de ultrafiltración fueron concordantes con el peso molecular del inhibidor (3.500 daltons), calculado mediante columnas de Sephadex G-75 (fig. 1).

Con el fin de comprobar si se trataba de un péptido, se estudió la estabilidad del inhibidor a altas temperaturas y frente a la tripsina. Ambos tratamientos no afectaron a la acción inhibidora (tabla I). La pérdida de poder inhibitorio después de 24 horas de diálisis a 4°C, contrasta con la estabilidad mostrada por el inhibidor durante este tiempo y a la misma temperatura, sin diálisis (tabla I), lo cual parece sugerir que se produce la ruptura de algún tipo de unión que libera al inhibidor y lo convierte en dializable.

Para dar respuesta a estas dos cuestiones se trató el inhibidor procedente del concentrado de la membrana de Millipore PSAC con ácido perclórico (PCA) sin encontrarse pérdida notable de inhibición después del tratamiento. Posteriormente, el eluato tratado con PCA, se ultrafiltró a través de la misma membrana de Millipore PSAC. Se obtuvo un filtrado que mantiene el poder inhibidor de la muestra tratada con PCA de la que se partió, y que contiene una forma ligera del inhibidor, cuyo peso molecular de 900 daltones fue calculado por medio de columnas de Sephadex G-75 (fig. 1). No se detectó proteína en el filtrado, lo cual parece concordar con la hipótesis expuesta anteriormente.

Ambas formas del inhibidor (pesada y ligera) actúan como inhibidores no-competitivos respecto al NADP⁺ y com-

Tabla I. *Efecto de distintos tratamientos sobre el inhibidor de la G6PDH.*

Muestras del concentrado de la membrana Millipore PSAC se sometieron a los tratamientos indicados. Posteriormente, alícuotas con volúmenes corregidos según la dilución impuesta por cada tratamiento, se añadieron a la mezcla de reacción. Todos los valores son media y S.E.M. de cinco determinaciones.

Tratamiento	Muestra (ml)	Actividad residual (%)
Ninguno	0,05	52,01 ± 1,02
80°C (10 min)	0,05	50,08 ± 2,71
Tripsina	0,1	53,31 ± 1,23
Diálisis	0,07	99,45 ± 2,45
4°C (24 h)	0,05	53,47 ± 1,86

petitivos respecto a la G6P. Este último resultado parecía sugerir algún tipo de similitud estructural del inhibidor con el sustrato glucídico; sin embargo, la estabilidad de éste frente a la fosfatasa alcalina y el peso molecular del inhibidor ligero, mucho mayor que los fosfo-ésteres de monosacárido, posibles inhibidores, descartan la posibilidad de que este tipo de moléculas sea el responsable de la inhibición.

La G6PDH de distintas fuentes es inhibida por derivados acil-CoA de cadena larga, entre los cuales, el palmitoil-CoA parece ser el más activo (5). Existen datos que parecen confirmar que el inhibidor ligero es el palmitoil-CoA, puesto que ambas moléculas presentan el mismo esquema cinético de inhibición (3,5). Así mismo, ambas moléculas presentan pesos moleculares análogos y son resistentes a la acción de la fosfatasa alcalina. No obstante, la identidad del inhibidor como palmitoil-CoA se demostró estudiando el efecto de las dos sustancias sobre la G6PDH en presencia de NADPH, respecto a distintas concentraciones de NADP⁺. Ambas formas del inhibidor y el palmitoil-CoA, a concentraciones fisiológicas, actúan como inhibidores no-competitivos respecto al NADP⁺, al contrario que el NADPH que actúa como

inhibidor competitivo, incrementando la K_m para $NADP^+$ de 4 a 36 μM . Sin embargo, cuando el NADPH inhibe al enzima en presencia de palmitoil-CoA o ambas formas del inhibidor, el esquema de inhibición pasa a ser de tipo no-competitivo descendiendo el valor de la K_m

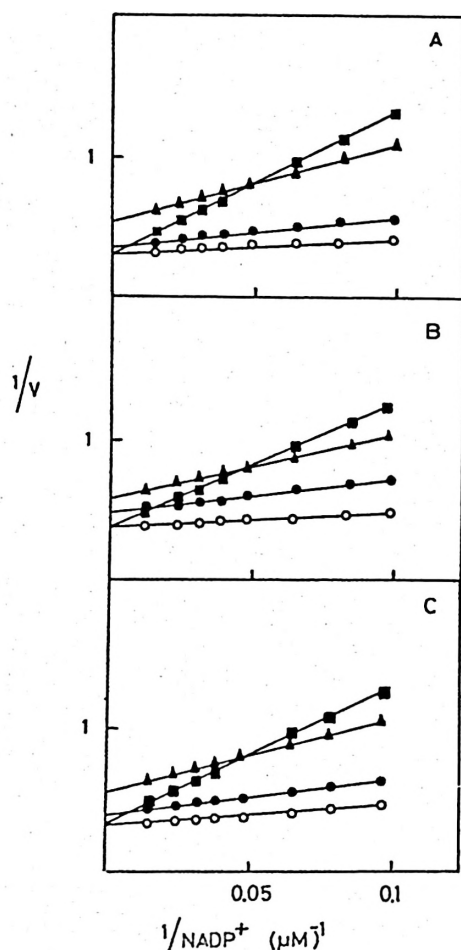


Fig. 2. Inhibición de la G6PDH por palmitoil-CoA y ambas formas de inhibidor en presencia y ausencia de NADPH.

A) 0,05 mM palmitoil-CoA. B) 0,05 ml concentrado Millipore PSAC. C) 0,2 ml de inhibidor ligero. (O) Enzima solo (●) Palmitoil-CoA o ambas formas de inhibidor. (■) 0,08 mM NADPH. (▲) 0,08 mM NADPH y las muestras anteriormente citadas de palmitoil-CoA e inhibidor.

hasta 10 μM , lo que indica un proceso de activación debido a un incremento de afinidad de la G6PDH por el $NADP^+$. A concentraciones elevadas de $NADP^+$, la inhibición parece ser la suma de las inhibiciones producidas por el NADPH y el palmitoil-CoA o inhibidor (situación de pequeños cocientes $NADPH/NADP^+$). Por el contrario, con concentraciones pequeñas de $NADP^+$ (cocientes $NADPH/NADP^+$ próximos a los fisiológicos) (1, 6, 8), la inhibición es menor que cuando se utiliza NADPH exclusivamente como inhibidor (fig. 2). Este proceso, de relativa activación respecto a la actividad obtenida en presencia de NADPH, es un resultado similar al encontrado por otros autores (1, 7), que hallaban mayor inhibición por NADPH usando G6PDH de extracto crudo dializado que cuando se usaba la misma fuente de enzima sin dializar.

Los resultados del presente trabajo permiten proponer que la forma ligera del inhibidor es el palmitoil-CoA, el cual afecta, según un mecanismo todavía no esclarecido, la inhibición de la G6PDH por el NADPH. El papel que desempeña esta sustancia en la regulación de la actividad G6PDH por el cociente $NADPH/NADP^+$, así como el estudio de la molécula inhibidora de mayor peso molecular serán temas de próximas investigaciones.

Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a la Profesora Dra. Dña. Ana María Galarza († 21/3/1985).

Resumen

Se detecta un fuerte inhibidor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en homogenados de hígado de rata. El inhibidor, aislado por técnicas de ultrafiltración, es estable frente a la tripsina y a altas temperaturas. El peso molecular, calculado por medio de columnas de Sephadex G-75 es de 3.500 daltons. Sin embargo, por tratamiento con ácido perclórico se obtiene una forma ligera de 900 dal-

nes. Ambas formas actúan como un inhibidor competitivo respecto a la G6P y muestran inhibición no-competitiva respecto al NADP⁺. Las propiedades físicas y cinéticas y el incremento de actividad G6PDH a baja concentración de NADP⁺, en presencia de NADPH e inhibidor o palmitoil-CoA, en relación con la actividad obtenida en presencia de NADPH solo, son fuertes evidencias para identificar al inhibidor ligero como palmitoil-CoA.

Palabras clave: Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, Palmitoil-CoA.

Bibliografía

1. Eggleston, L. V. y Krebs, H. A.: *Biochem. J.*, 138, 425-435, 1974.
2. Hori, S. H. y Sado, Y.: *J. Fac. Sci. Hokk. Univ.*, 19, 515-529, 1974.
3. Kawaguchi, A. y Bloch, K.: *J. Biol. Chem.*, 249, 5793-5800, 1974.
4. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. R. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
5. Mita, M. y Yasumasu, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 19-26, 1983.
6. Rodríguez-Segade, S., Carrión, A. y Freire, M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 89, 148-154, 1979.
7. Rodríguez-Segade, S., Freire, M. y Carrión, A.: *Biochem. J.*, 170, 577-582, 1978.
8. Rodríguez-Segade, S., Ramos-Martínez, J. I. y Freire, M.: *Biochem. J.*, 231, 805-807, 1985.
9. Sapag-Hagar, M., Lagunas, R. y Sols, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 50, 179-185, 1973.
10. Van Schaftingen, E., Hue, L. y Hers, H. G.: *Biochem. J.*, 192, 897-901, 1980.

