

Análogos estructurales del piruvato. Comportamiento como sustratos o inhibidores de la LDH

C. Lluís y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona

(Recibido el 15 de mayo de 1975)

C. LLUIS and J. BOZAL. *LDH and Structural Analogues of Pyruvate*. Rev. esp. Fisiol., 32, 9-14. 1976.

Pyruvate related compounds have been tested for their active or inhibitory properties on LDH.

Special structure features were needed for compounds to be bound to the enzyme active site.

Pyruvate and the LDH molecule were bound by the interaction of the carboxyl group or its ester derivative, with the enzyme.

Ethyl pyruvate seemed to behave as a substrate of the enzyme whereas acetophenone, ethyl acetoacetate and β -oxoglutarate did not act as substrates or inhibitors of LDH.

Phenyl pyruvate, α -oxoglutarate and L-mandelate are not substrates but inhibitors of the LDH.

It seems that a structure having a carbonyl group in the α -position to the carboxyl is required for the binding of a compound to the LDH molecule.

Glyoxylate α -oxobutyrate and α -oxovalerianate appear to be worse LDH substrates than pyruvate itself. This seems to suggest that the shortening or the extension of the pyruvate aliphatic chain induces a decrease of the affinity of the enzyme towards their substrate homologues.

Se describe la actuación de moléculas cuyas estructuras conservan analogías con las del piruvato y el L-lactato, sustratos habituales de la lacticodeshidrogenasa (LDH), con objeto de establecer algunos de los requerimientos estructurales que permiten la unión de estas últimas al centro activo del enzima y su comportamiento como sustratos o inhibidores del mismo.

Se ha sugerido que el sustrato de la LDH es la forma ceto del piruvato (2,4). TIENHAARA (8) estableció que el verdadero sustrato es la forma ceto no hidratada con preferencia a las formas enólica o hidratada; sugiere que esta última sería la responsable de la inhibición provocada por el piruvato.

Los complejos binarios LDH-NADH se unen con hidroxiaácidos cuyo grupo hidro-

xilo en posición α debe poseer configuración L (9); aunque este sustituyente no es esencial para la formación del complejo terciario activo impide que la región del enzima implicada sea ocupada por un hidroxilo que se halle en configuración opuesta.

La asociación del isocitrato, del mandelato y del α -hidroxiisovalerianato al complejo binario LDH-NADH sugiere que la introducción de grupos voluminosos en posición β no impide la formación de los complejos ternarios; ésta no tiene lugar si existe un grupo hidroxilo en aquella posición, como ocurre con el mesotartrato, el β -hidroxibutirato y posiblemente con el citrato.

Se ha postulado (6) que los compuestos de estructura $R-CO-COOH$, en los que R varía ampliamente (fluoropiruvato, α -oxobutirato y α -oxovalerianato), pueden ser sustratos poco preferentes o inhibidores de la LDH, pero si desaparece el grupo carboxilo no son ni inhibidores ni sustratos del enzima.

Los valores de K_m del α -oxobutirato y el α -oxovalerianato respecto al isoenzima H_1 son menores que con el M_1 , mientras que la K_m del α -hidroxibutirato respecto a ambos isoenzimas es prácticamente igual (7).

Material y métodos

El enzima es LDH de hígado de pollo obtenida según Lluís *et al.* (5). La actividad específica del preparado es 555 U/mg proteína (1 unidad = $\Delta D.O./min$). Cada gramo del purificado contiene 200 mg de proteína.

Como sustratos o inhibidores se han empleado: fenilpiruvato sódico (Sigma); acetofenona, piruvato de etilo, los ácidos glioxílico monohidratado, hidroxifenilacético y α -oxobutírico, procedentes de Merck; acetoacetato de etilo y los ácidos β -oxoglutarico y 2-oxovalerianico de procedencia Fluka y fenilpiruvato sódico (Sigma).

La actividad LDH se midió por lectura de los decrementos de absorbancia del NADH a $\lambda = 340$ nm, en un espectrofotómetro Beckman DBG-T, provisto de inscriptor, a $30 \pm 0,1^\circ C$, en cubetas de 3 ml y de 1 cm de paso de luz y en medio de tampón de fosfato sódico 50 mM, de pH = 7,4. La reacción se inició con la adición de LDH (5 μg purificado) hasta completar el volumen de 3 ml. Las muestras en incubación contenían NADH (1×10^{-4} M) y piruvato (3×10^{-4} M), que fue sustituido por el análogo estructural cuando se investigó su comportamiento como sustrato.

Los parámetros cinéticos aparentes, K_m y $V_{máx}$, se han calculado por el método de LINEWEAVER-BURK (3).

La determinación del centro de unión para dos sustratos copresentes se ha realizado por el método de DIXON (1) aplicable a mezclas no equimoleculares de ambos sustratos; su competencia por un mismo centro activo se expresa por la ecuación:

$$V_T^{(1)} = \frac{V_a \frac{a}{K_a} + V_b \frac{b}{K_b}}{1 + \frac{a}{K_a} + \frac{b}{K_b}} \quad (I)$$

y cuando los sustratos actúan sobre centros del enzima independientes entre sí por:

$$V_T^{(2)} = \frac{V_a}{K_a + a} + \frac{V_b}{K_b + b} \quad (II)$$

Resultados

Efecto de análogos estructurales del piruvato que son sustratos de la LDH. Se ha estudiado el comportamiento como sustratos o inhibidores de compuestos de tipo $R-CO-COOH$, determinando la influencia que inducen las variaciones introducidas en la longitud de la cadena del grupo $-R$, así como la intervención del grupo carboxilo en la unión del piruvato a la LDH.

La concentración de LDH fue la indicada salvo en las experiencias efectuadas con α -oxovalerianato que fue de 50 μ g en los 3 ml de incubado. Por representación gráfica de las velocidades iniciales (3) se obtienen los valores de K_m y V_{max} de los diversos compuestos (tabla I).

Sugieren los resultados que no se precisa de la existencia del grupo carboxilo libre para que el sustrato se una al enzima (piruvato de etilo) y que el alargamiento de la cadena alifática hasta 3 átomos de C (α -oxovalerianato) o la supresión (glioxilato) no provoca la pérdida de la condición de sustratos.

El piruvato de etilo (5×10^{-3} M), el α -oxobutirato (5×10^{-2} M) y el glioxilato ($2,4 \times 10^{-2}$ M) inducen inhibición de la LDH por exceso de sustrato; la provocada por el último crece al disminuir la concentración de NADH.

En el sistema piruvato (5×10^{-3} M) a 3×10^{-4} M)-LDH (5 μ g/3 ml inc.)-NADH (1×10^{-4} M), el α -oxovalerianato (1×10^{-2} M y 5×10^{-2} M) es inhibidor acompetitivo respecto al NADH ($K_{ii} = 1,75 \times 10^{-2}$ M) y no competitivo respecto al piruvato ($K_{ii} = 2 \times 10^{-2}$ M, $K_{ip} = 3 \times 10^{-2}$

Tabla I. *Substratos análogos de la LDH hepática de pollo.*

Substrato	Concentración M $\times 10^3$	K_m M $\times 10^3$	V_{max} (D.O./min) $\times 10^2$
CH ₃ -CO-COOCH ₂ CH ₃	0,1-10	1,3	0,1
CH ₃ -CH ₂ -CO-COO ⁻	1,0-50	2,0	5,0
CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CO-COO ⁻	0,5-50	5,7	6,3
HOC-COO ⁻	0,4-80	3,3	6

M); mientras que en el sistema inverso, con NAD (3×10^{-3} M), L-lactato (5×10^{-3} M a $1,66 \times 10^{-2}$ M) y LDH (16,6 μ g de purificado/3 ml inc.) inhibe competitivamente respecto al L-lactato ($K_{ip} = 3,8 \times 10^{-3}$ M). Sugieren los resultados que el α -oxobutirato al actuar como inhibidor se fija en un centro distinto que el piruvato y que es aquel en que se une al L-lactato.

Cinética de mezclas no equimolares de sustratos. El piruvato y sus análogos estructurales compiten por el mismo centro activo de la LDH, tal como ha podido demostrarse mediante el método de DIXON (1) al trabajar con mezclas binarias no

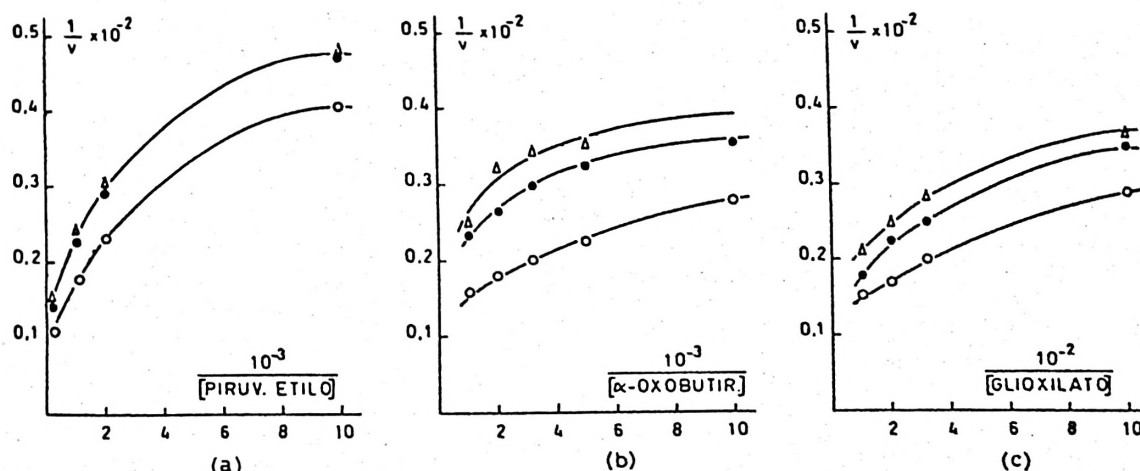


Fig. 1. *Cinética de mezclas binarias no equimolares.* [NADH] = 1×10^{-4} M; [LDH] = 5 μ g en 3 ml; tampón fosfatos 50 mM pH 7,4; K_m (pir.) = $5,3 \times 10^{-5}$ M; V_{max} (pir.) = $5,6 \times 10^{-2}$ Δ D.O./min; (O) velocidad teórica V_T^2 ; (●) velocidad teórica V_T^1 ; (Δ) velocidad experimental. a) piruvato (3×10^{-3} M)-piruvato de etilo; b) piruvato (3×10^{-3} M)- α -oxobutirato; c) piruvato ($2,5 \times 10^{-3}$ M)-glioxilato.

equimolares constituidas por piruvato y piruvato de etilo (fig. 1a), α -oxobutirato (fig. 1b), o glioxilato (fig. 1c).

Las experiencias para la medida de las velocidades iniciales de las mezclas no equimolares de piruvato y el otro sustrato se efectuaron como habitualmente.

Los valores de K_m y $V_{m\max}$ del piruvato utilizados son: $5,3 \times 10^{-3}$ M y $5,6 \times 10^{-2}$ Δ D.O./min; los correspondientes a los demás sustratos aparecen en la tabla I.

Análogos estructurales que no afectan o inhiben a la LDH. Se ha tratado de establecer cuáles son las modificaciones de la estructura general $R-CO-COOH$, que provocan en los compuestos la pérdida de su condición de sustratos de la LDH y determinan que la actividad del enzima reste inalterada o bien sea inhibida.

El comportamiento de los diferentes compuestos se determinó en las condiciones experimentales habituales en el sistema directo o con NAD ($3,3 \times 10^{-3}$ M) en el sistema inverso (tabla II).

Se pone de manifiesto que la desaparición del grupo carboxilo (acetofenona) impide la unión del compuesto a la LDH y lo mismo ocurre cuando el grupo carbonilo se halla en posición β respecto de aquél, tal como se observa con el acetoacetato de etilo y en el β -oxoglutarato.

Tabla II. *Distintos efectores de la actividad LDH de hígado de pollo.*

Estructura del compuesto	Concentración $M \times 10^3$	Inhibición (%)	
		sistema directo	sistema inverso
$CH_3-CO-C_2H_5$	10	NO	NO
$CH_3-CO-CH_2-COOCH_2CH_3$	50	NO	NO
$-OOC-CH_2-CH_2-CO-COO^-$	6	25	5
$-OCC-CH-CO-CH_2-COO^-$	30	NO	NO
$C_2H_5-CH-CO-COO^-$	10	82	96
$C_2H_5-CHOH-COO^-$	75	52	49

El que el α -oxoglutarato y el fenilpiruvato inhiban la actividad LDH confirma la necesidad de que los grupos carbonilo y carboxilo deben hallarse en posición contigua para que se efectúe su unión a la molécula enzimática, y es la naturaleza de R la que determina, en ambos casos, la pérdida de la condición de sustratos.

El comportamiento de L-mandelato sugiere la necesidad de que los grupos hidroxilo y carboxilo se hallen también en posición contigua para que se efectúe la unión al enzima en analogía a lo observado con el L-lactato.

Discusión

Se describen en el presente trabajo los requerimientos estructurales que deben cumplir los sustratos de la LDH para que se establezca la unión efectiva con el enzima. Para ello se han investigado las influencias que provocan en la actividad enzimática determinadas moléculas, análogas estructurales del piruvato, que conservan todavía el carácter de sustratos y también el efecto producido por sustancias que, si bien ya no se comportan como sustratos, muestran aún capacidad de unión a la molécula del enzima.

El piruvato de etilo es sustrato de la LDH, lo que sugiere que la presencia del grupo carboxilo libre no es imprescindible ni para la fijación del sustrato al enzima ni para que suceda la transformación catalítica. El efecto que provoca la variación de la longitud de la cadena alifática del piruvato se ha observado con el α -oxobutirato, el α -oxovalerianato y el glioxilato; todos ellos son sustratos de la LDH y al igual que el piruvato de etilo poseen valores de K_m superiores a la del piruvato y provocan inhibición de la actividad enzimática por exceso de sustrato.

El piruvato de etilo, el α -oxobutirato y el glioxilato se transforman en el mismo centro activo de la LDH en que lo hace el piruvato, tal como se ha demostrado al trabajar con mezclas no equimolares de

piruvato y de cada uno de los substratos citados.

El α -oxovalerianato, que es sustrato de la LDH, actúa también como inhibidor no competitivo respecto al piruvato y acompetitivo respecto del NADH, siendo inhibidor competitivo respecto al L-lactato en presencia de NAD.

El conjunto de los resultados permite establecer que la supresión de la cadena alifática del piruvato o su alargamiento hasta tres átomos de carbono, no impide la unión de los compuestos a la molécula de LDH si bien disminuye la afinidad del enzima por el sustrato.

La eliminación del grupo carboxilo del piruvato determina que el compuesto análogo pierda el carácter de sustrato o de inhibidor, como ocurre en la acetofenona.

Por otra parte, el desplazamiento del grupo carbonilo a la posición β respecto del grupo carboxilo, impide la unión de los compuestos a la molécula de LDH y ya no se comportan como sustratos o inhibidores (acetoacetato de etilo y β -oxoglutarato).

El que el α -oxovalerianato sea sustrato e inhibidor de la LDH y que el α -oxoglutarato y el fenilpiruvato inhiban al enzima, confirma que se precisa de la presencia de un grupo carbonilo en posición α respecto al carboxilo para la fijación de los compuestos a la molécula de LDH y dependerá de la naturaleza del grupo —R el que aquéllos actúen como sustratos o inhibidores del enzima.

Resumen

Las experiencias efectuadas con diversos compuestos relacionados estructuralmente con

el piruvato, con objeto de determinar si son sustratos o inhibidores de la LDH, ponen de relieve algunas de las particularidades que se precisan para su unión al centro activo del enzima.

El piruvato se une a la molécula de LDH a través del grupo carboxilo, que puede hallarse libre o esterificado. En efecto, el piruvato de etilo se comporta como sustrato, mientras que la acetofenona, el acetoacetato de etilo y el β -oxoglutarato y el L-mandelato, inhiben a la LDH. Se pone de manifiesto que en la estructura de los compuestos que se unen a la LDH debe existir un grupo carbonilo en posición α respecto del grupo carboxilo.

El glioxilato, el α -oxobutirato y el α -oxovalerianato son peores sustratos de la LDH que el piruvato, lo que indica que la supresión o el alargamiento de la cadena alifática del piruvato induce un decremento de la afinidad del enzima hacia los homólogos del sustrato.

Bibliografía

1. DIXON, M. y WEBB, C. E.: *Enzymes* (2.^a edic.). Longman's Green, Londres, 1967, pág. 87.
2. FROMM, H. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 540, 1965.
3. LINEWEAVER, M. y BURK, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1939.
4. LOEWUS, F. A., CHEN, T. T., VENNESLAND, S.: *J. Biol. Chem.*, **212**, 787, 1955.
5. LLUÍS, C., GUBERT, S. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 223, 1975.
6. NEILANDS, C. B.: *J. Biol. Chem.*, **225**, 1036, 1953.
7. NISSELBAUM, G. S., PACKER, E. y BODANSKY, O.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2830, 1964.
8. TIENHAARA, R. y MEANY, G.: *Biochemistry*, **12**, 2067, 1973.
9. WINER, A. D. y SCHWERT, G. W.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1155, 1959.

