

## Unión de NAD (NADH) a la lactatodeshidrogenasa de hígado de pollo

C. Lluís y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona

(Recibido el 28 de octubre de 1975)

C. LLUIS and J. BOZAL. *NAD (NADH) Binding to Chicken Liver Lactatedehydrogenase*. Rev. esp. Fisiol., 32, 143-148. 1976.

Some information about the lactate dehydrogenase NAD binding site has been obtained by working with coenzymes analogs of incomplete molecules.

5'-AMP, 5'-ADP, ATP, 5'-c-AMP and 3'(2)-AMP inhibit chicken liver LDH activity competitively with NADH.

5'-AMP and 5'-ADP show a stronger inhibition power than ATP, suggesting that the presence of one or two phosphate groups at the 5' position of adenosine, is essential for the binding of the coenzyme analogs at the enzyme binding site.

Ribose and ribose-5'-P do not appear to inhibit the LDH activity, proving that purine base lacking mononucleotides do not bind to the enzyme.

5'-ADPG inhibits LDH activity in the exactly as 5'-ADP, showing that ribose moiety may be replaced by glucose, without considerable effects on the coenzyme analog binding.

2'-desoxidenosin-5'-phosphate proves to be a poorer inhibitor of the LDH activity than 5'-AMP, indicating that an interaction between the —OH groups and the aminoacids of the LDH active center takes place.

Nicotinamide does not produce any inhibition effect, while NMN and CMP induce a much weaker inhibition than the adenine analogues, thus indicating a lesser binding capacity to the enzyme. Therefore, the LDH binding site seems to show some definite specificity towards the adenina groups of the coenzyme.

Las LDH<sub>n</sub> de organismos superiores son específicas para el NAD, aunque reaccionan con el NADP en menor extensión. El estudio cristalográfico del centro activo de la LDH M<sub>1</sub>, de lija, al grado de resolución de 2,5 Å sugiere que el coenzima se une con cada una de las subunidades en una forma abierta en la que la longitud

comprendida entre los anillos de adenina y de nicotinamida es de 15 Å (5). En la formación del complejo LDH-NAD-piruvato, este último se sitúa sobre el anillo de la nicotinamida.

En experiencias efectuadas con análogos del NAD en los que la adenina ha sido sustituida por diversas purinas (5, 6)

o por nicotinamida (10, 14), han permitido establecer que la interacción del coenzima y el enzima se establece a través de la citada purina y determina que la nicotinamida se sitúe en la región del centro de la LDH en la que se realiza la transformación catalítica.

Los análogos del NAD, en los que se ha sustituido la adenina, provocan el incremento del valor de  $K_m$ , mientras que apenas varía la  $V_{max}$ , confirmando la intervención de la purina en la unión del NAD y la LDH.

El nucleótido de dinicotinamida actúa como coenzima de la LDH pero sólo se reduce uno de sus dos anillos (9).

Han sido poco estudiados los efectos provocados por la sustitución de la porción de D-ribosa, adyacente al anillo de adenina en el NAD, si bien la sustitución de esta D-ribosa por D-glucosa induce la pérdida de actividad como coenzima del análogo estructural que se origina (3).

Estudios de rayos X (11) efectuados con análogos del coenzima que no poseen el anillo de la nicotinamida, ponen de manifiesto que el 5'-AMP, el ADP o el ADPR inducen idénticas variaciones de conformación en la LDH que las provocadas por el NAD. La adenosina, el 5'-acetato de adenosina y la adenina (2) no provocan efecto alguno, al igual que el mononucleótido de nicotinamida, ya sea en forma oxidada o reducida. Los mencionados fosfatos de adenina se comportan como inhibidores de los isoenzimas de la LDH de tipo H y M (4).

Puesto que la unión de los coenzimas a la proteína enzimática (1) provoca en ella notables cambios de conformación, se estudia en el presente trabajo la influencia que ejercen los grupos fosfato, ribosa y adenina constituyentes del coenzima, en la mencionada asociación. El estudio se ha efectuado determinando el efecto que provocan, sobre la actividad de la LDH de hígado de pollo, moléculas análogas al NAD o al NADH cuya complejidad estructural aumentaba paulatinamente.

## Material y métodos

Se ha empleado LDH de hígado de pollo obtenida según Lluís *et al.* (8). La actividad específica del preparado es 555 unidades/mg proteína (1 unidad =  $\Delta$ D.O./minuto). El preparado purificado se conserva a 4° C en forma de precipitado por la acción del sulfato amónico y 1 g del precipitado contiene 200 mg de proteína.

Los inhibidores empleados, relacionados con el NAD y sus precedencias son: adenina, adenosina, 3',5'-ciclofosfato de adenosina, ATP, nicotinamida y D-ribosa, de Merck; 5'-ADPG, 5'-AMP y NMN, de Boehringer; Tris-ADP, 5'-fosfato de ribosa, de Sigma; 3'(2')-AMP, 2'-desoxiadenosín-5'-monofosfato, de Fluka, y CMP, de NCB. Se utilizaron disoluciones de los inhibidores en tampón de fosfatos sódico 50 mM, de pH 7,4, ajustados a dicho pH.

La actividad LDH se determinó leyendo los decrementos de absorbancia del NADH a  $\lambda = 340$  nm, en un espectrofotómetro Beckman DBGT, provisto de inscriptor, a  $30 \pm 0,1$ ° C, en cubetas de 3 ml y 1 cm de paso de luz. Las muestras contenían tampón de fosfato sódico 50 mM, de pH = 7,4, NADH ( $1 \times 10^{-4}$  M), piruvato ( $3 \times 10^{-4}$  M) y el volumen de disolución de inhibidor cuya acción se estudia. La reacción se inició con la adición de LDH (5  $\mu$ g del purificado) hasta completar el volumen de 3 ml.

## Resultados

*Efecto de la adenina, la adenosina y de diversos ácidos adenílicos en la actividad LDH.* La intervención de los grupos fosfato del NAD en la unión del coenzima al enzima, se ha puesto de manifiesto determinando el efecto inhibitorio que la adenina y algunos de sus derivados ejercen sobre la actividad LDH (tabla I).

No se ha observado incremento en los porcentajes de inhibición al mantener en contacto previo (120 min.) las sustancias citadas y la LDH. Por su parte, la adenina

Tabla I. Efecto sobre la LDH de la adenina y derivados.

Inhibidor $2 \times 10^{-2}M$	Inhibición %
Adenina	0
Adenosina	10
5'-AMP	66
3'(2')-AMP	16
5'-ADP	71
ATP	40
Adenosín-3',5'-ciclofosfato	52

y la adenosina (ambas  $2 \times 10^{-2} M$ ) no inhiben a muestras del enzima cuya concentración es cinco veces inferior a la empleada en las experiencias anteriores; resultado que difiere de lo afirmado por otros autores (2).

El que la adenina y la adenosina no provoquen inhibición, mientras que los ácidos adenílicos inhiben al sistema NADH-LDH-piruvato, indica que la capacidad de unión al enzima, de estas porciones del NADH, únicamente es significativa en presencia de los grupos fosfato.

El mayor porcentaje de la inhibición inducida por el 5'-AMP, en comparación con el 3'(2')-AMP y el 3',5'-ciclofosfato de adenosina, sugiere que sea el grupo 5'-fosfato el que posee mayor especificidad. El que las inhibiciones provocadas por el 5'-ADP sean superiores a las inducidas por el 5'-monofosfato y el ATP, sugiere que sean hasta dos los grupos fos-

fatos unidos al anillo de ribosa adyacente al anillo de adenina los que ejercen una interacción adecuada con la molécula de LDH.

La cinética de la inhibición inducida por el 5'-AMP, el ATP y el 3',5'-ciclofosfato de adenosina permite comprobar que las sustancias se unen a la LDH en el «locus de unión» propio de los coenzimas (tabla II).

*Efecto de la porción azúcar del NAD en la actividad LDH.* El papel desempeñado por la D-ribosa, adyacente al anillo de adenina en la molécula del coenzima, en la unión de éste a la LDH, no ha sido aclarado todavía. Se ha tratado de ponerlo de manifiesto determinando la acción que inducen sobre la actividad LDH, la D-ribosa y compuestos relacionados, en las condiciones experimentales habituales.

La D-ribosa ( $1 \times 10^{-2} M$ ) y el 5'-fosfato de D-ribosa ( $3 \times 10^{-2} M$ ) no inhiben la actividad LDH, en tanto que el 5'-ADPG ( $2 \times 10^{-2} M$ ) lo hace en un 63 % y el 2'-desoxiadenosín-5'-monofosfato ( $4 \times 10^{-4} M$ ) en un 24 %.

Los porcentajes de inhibición no experimentan incremento alguno cuando se preincuba el enzima y las sustancias mencionadas durante intervalos de hasta 120 minutos.

El que la D-ribosa y el 5'-monofosfato de ribosa no inhiban a la LDH, en el sistema NADH-LDH-piruvato, indica que la

Tabla II. Cinética de la inhibición de LDH por ácidos adenílicos.  
Substratos: NADH  $M \times 10^{-2}$  (variable): 1 a 10; piruvato  $M \times 10^{-4}$  (constante): 3;  
NADH  $M \times 10^{-4}$  (constante): 1; piruvato  $M \times 10^{-5}$  (variable): 2,5 a 30.

Inhibidor	$M \times 10^{-2}$	Substrato Variable	Carácter cinético	Constantes inhibición* $M \times 10^{-2}$	
				Kii	Kip
5'-AMP	8 y 20	NADH	C	—	0.72
5'-AMP	8 y 20	Piruvato	NC	10	12
ATP	9 y 20	NADH	C	—	2.6
ATP	9 y 20	Piruvato	NC	30	29
Adenosín-3'-5'-ciclofosfato	9 y 20	NADH	C	—	3.1

\* Determinadas por el método de Lineweaver-Burk (7).

molécula de D-ribosa del coenzima no es capaz de inducir, por sí sola, ninguna unión estable con la LDH aun cuando se halle unida a un grupo fosfato. El 5'-ADPG se muestra inhibidor de la LDH y la inhibición que induce es similar a la provocada por el 5'-ADP (tabla I). De la comparación de ambos resultados puede deducirse que la sustitución de la D-ribosa en el 5'-ADP, por D-glucosa, para originar el 5'-ADPG, no provoca disminución notable en la capacidad de unión de los análogos del coenzima al enzima.

Los menores porcentajes de inhibición inducidos por el 2'-desoxiadenosín-5'-monofosfato, ponen de manifiesto la intervención de los grupos OH— del azúcar en el acoplamiento de la molécula del coenzima a la de LDH.

*Efecto de la nicotinamida y de otros nucleótidos en la actividad LDH.* Se ha postulado (2, 13) que el «locus de unión» de los coenzimas no exhibe gran especificidad por el anillo de adenina. Se ha tratado aquí de poner de manifiesto si los anillos de la nicotinamida o de la citidina son capaces de sustituir a la adenina en dicha unión determinando el efecto que sobre la actividad LDH provocan compuestos relacionados. Mientras que la nicotinamida ( $2 \times 10^{-2}$  M) no afecta a la actividad del enzima, en las condiciones habituales, el NMN y el CMP (ambos  $2 \times 10^{-2}$  M) solamente ejercen una ligera inhibición (10 y 11 %, respectivamente).

La nicotinamida ( $2 \times 10^{-2}$  M), por su parte, no inhibe aun después de preincubación (60 minutos) y ello podría corresponderse con la acción nula de la adenina.

El ligero efecto inhibidor del NMN podría sugerir que la unión del anillo de nicotinamida al enzima sea mucho más lábil que la que se establece con el 5'-AMP, permitiendo su fácil desplazamiento por el NADH presente en el medio de incubación. La suposición no es correcta ya que al determinar la actividad LDH frente a bajas concentraciones de NADH ( $1 \times$

$10^{-5}$  M y  $2 \times 10^{-5}$  M), en ausencia y en presencia de NMN ( $2 \times 10^{-2}$  M), la inhibición que provoca es baja (12 y 15 %, respectivamente); ello indica que el NMN no es desplazado por el NADH y pone de manifiesto la preferencia del «locus de unión» de los coenzimas por la adenina.

### Discusión

Puesto que la unión de los coenzimas a la proteína enzimática provoca en ella notables cambios de conformación, se ha investigado la influencia que ejercen por sí solas algunas de las porciones de la molécula de NAD (NADH) en la unión a la molécula de LDH.

La adenina y la adenosina no inhiben la actividad LDH, aun después de un prolongado período de preincubación con el enzima, y ello sugiere que ambos no se unen a la LDH, o bien que su unión sea tan lábil que pueden ser fácilmente desplazados de ella por el NADH presente en el medio.

Las destacadas inhibiciones inducidas por el 5'-AMP y 5'-ADP sugieren que sea precisa la presencia de uno o dos grupos fosfato unidos al anillo de ribosa adyacente al de adenina para la unión del coenzima análogo a la LDH, ya que la inhibición inducida por el ATP es algo menor, los tres nucleótidos se fijan, sin embargo, al mismo centro que el NAD y el NADH dado su carácter de inhibidores competitivos.

El resultado obtenido con el ATP se halla en concordancia con el hecho de que en el NAD existen únicamente dos restos de fosfato entre las porciones de la adenosina y de la nicotinamida; cabe esperar que la presencia de tres grupos fosfato en la posesión 5' de la ribosa adyacente a la adenina pueda provocar impedimentos estéricos que repercutan, de modo desfavorable, en la unión del coenzima a la LDH y de ahí el menor porcentaje de inhibición.

El carácter inhibidor de la actividad

LDH decrece desde el 5'-AMP al 3'(2')-AMP, lo que permite afirmar que la posición 5' del fosfato es la que facilita preferentemente la fijación de la adenosina a su *locus* característico, probablemente por establecimiento de uniones de naturaleza electrostática entre los grupos fosfato y los aminoácidos de la proteína.

Cuando se introducen modificaciones en el azúcar adyacente al anillo de nicotinamida se registran efectos muy acusados en la actividad del coenzima (12). En este trabajo se ha podido comprobar que la D-ribosa por sí sola o el 5'-fosfato de ribosa no inhiben la actividad del enzima y ello es indicio de que la porción azúcar del coenzima no se une a la LDH en ausencia del anillo de adenina. Por otra parte, la comparación de los resultados obtenidos con el 5'-ADP y el 5'-ADPG muestran que se produce un ligero descenso de la capacidad de interacción de la adenosina-glucosa con el «locus de unión» de los coenzimas, si bien la sustitución del azúcar adyacente a la adenina no produce incremento notable del poder inhibitor de dicha sustancia.

El efecto inhibitor del 2'-desoxiadenosín-5'-monofosfato es menor que el inducido por el 5'-AMP o el 5'-ADPG y ello indica la intervención de los grupos —OH en la unión de los coenzimas análogos a la LDH, probablemente por establecimiento de uniones por puente de hidrógeno entre el azúcar y los restos de aminoácidos de la proteína.

A pesar de la inespecificidad postulada para el anillo de adenina, la preferencia por la adenosina es notoria, ya que la nicotinamida o el mononucleótido de nicotinamida no provocan efecto inhibitor alguno en la actividad LDH. Esto sugiere que no se ha podido unir el anillo de nicotinamida al centro de unión de la adenosina, o bien que esta unión sea lo suficientemente lábil, y la base y el NMN son desplazados inmediatamente por el NADH presente en el medio de incubación. Por otra parte, tampoco se observa

efecto inhibitor alguno por el citidín-monofosfato, lo cual confirmaría la suposición formulada.

### Resumen

El empleo de compuestos análogos del coenzima, que carecían de parte de su molécula, permite obtener información acerca del centro de la LDH de hígado de pollo al que se une el NAD.

Los 5'-AMP, 5'-ADP, ATP, 5'-c-AMP, 3'(2')-AMP son inhibidores competitivos de la LDH respecto al NADH. Los dos primeros son los más destacados, lo que demuestra que la presencia de uno o dos grupos fosfato en la posición 5' de la adenosina es esencial en la unión entre el coenzima y el enzima. La D-ribosa y el D-riboso-5-P no inhiben a la LDH, se demuestra con ello que la adenina es indispensable en la unión de los nucleótidos al enzima.

Las inhibiciones provocadas por el 5'-ADPG y el 5'-ADP son similares; por tanto, la sustitución de la D-ribosa por la D-glucosa no afecta significativamente a la capacidad de unión del coenzima análogo. La ligera inhibición que induce el 2'-desoxiadenosín-5'-P, comparada con la exhibida por el 5'-AMP, pone de manifiesto la interacción de los grupos —OH del azúcar del coenzima con los restos aminoácidos del centro activo de la LDH.

La nicotinamida no ejerce efecto inhibitor y las inhibiciones que provocan el NMN y el CMP son inferiores a las exhibidas por los análogos de adenina, ello es indicio de su menor capacidad de unión al enzima; se confirma con ello la especificidad del centro de unión del enzima a dicha purina.

### Bibliografía

1. ADAMS, M. J., BUEHNER, M., CHANDRASEKHAR, K., FORD, G. C., HARCKERT, M. L., LILGAS, A., ROSSMAN, M. G., SMILEY, I. E., ALLISON, W. S., EVERSE, J., KAPLAN, N. O. y TAYLOR, S. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 1968-72, 1973.
2. ADAMS, M. J., MCPERSON, A., ROSSMAN, M. G., SCHEVITZ, R. W., SMILEY, I. E. y WONACOTT, A. J.: En «Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases» (H. Sund, ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1970, páginas 157-74.

3. FAWCETT, C. P. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1709-15, 1962.
4. GEYER, H.: *Z. Phys. Chem.*, **348**, 823-28, 1967.
5. KAPLAN, N. O.: *Proc. 5th Int. Congress of Biochem.* (Vol. III), Pergamon, Press Oxford, 1963, págs. 97-101.
6. KAPLAN, N. O.: *Proc. 5th Int. Congress of Biochem.* (Vol. IV), Pergamon, Press Oxford, 1963, págs. 295-309.
7. LINEWEAVER, M. y BURK, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-66, 1934.
8. LLUÍS, C., GUBERT, S. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 223-233, 1975.
9. PFLEIDERER, G., SANN, E. y ORTANDERL, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 39-49, 1963.
10. PFLEIDERER, G., WOENCKHAUS, C., SCHOLZ, K. y HELLER, H.: *Liebigs Ann. Chem.*, **675**, 205-12, 1964.
11. SARMA, R. H. y KAPLAN, N. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **67**, 1375-82, 1970.
12. SCHELLENBERG, K. A.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1815-20, 1967.
13. SCHWERT, G. W.: En «Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases» (H. Sund, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1970, páginas 135-143.
14. WOENCKHAUS, C. y JECK, R.: *Z. Naturforsch.*, **B24**, 1436-41, 1969.