

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de hepatopáncreas de mejillón *

M. Silva-Pando, A. Carrión-Angosto¹ y M. Ruiz-Amil²

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Santiago de Compostela

(Recibido el 3 de agosto de 1976)

M. SILVA-PANDO, A. CARRION-ANGOSTO and M. RUIZ-AMIL. *Glucose-6-phosphate-dehydrogenase from Sea Mussel Hepatopancreas*. Rev. esp. Fisiol., 34, 1-8. 1978.

Glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity was found in the subcellular components of the sea mussel *Mytilus edulis* L., most of it, 99.42 %, in the supernatant (cytosolic) fraction. A mitochondrial form of glucose-6-phosphate-dehydrogenase of diverse exhibiting coenzyme specificity towards NAD⁺ and NADP⁺ was solubilized. The inhibitory effect of some phosphate compounds on cytosolic glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity, has been studied. The inhibition constants for fructose-1,6-diphosphate, and phosphoenol pyruvate in relation to the glucose-6-phosphate substrate, have been determined. Cytosolic enzyme activity dependence on pH has been tested with and without fructose diphosphate. Lastly, the inhibition rate of various fructose diphosphate concentrations against constant substrate concentrations have been determined, as well as the inhibitory effects by the simultaneous action of fructose diphosphate and NADPH.

En hepatopáncreas de mejillón, la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), que inicia el ciclo de las pentosas, varía bajo diversas condiciones ambientales (4), pudiendo representar un mecanismo de regulación de toda la secuencia metabólica, ya que las constantes de Michaelis para ambos sustratos son muy bajas (14) y permiten que esta vía compita muy eficientemente con la glu-

cólisis cuando las concentraciones de glucosa-6-fosfato (G6P) son limitantes. Diversos autores han investigado las propiedades cinéticas y regulatorias de la G6PDH de distintos orígenes (7, 12, 19); OLIVE *et al.* (11) demuestran la existencia de tres tipos de G6PDH, basándose en la especificidad para el nucleótido. Se incluyen en un grupo la G6PDH de levadura, *Candida utilis* y *Escherichia coli*, específicas para el NADP⁺. En otro grupo las enzimas de *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hydrogenomonas* y *Thiobacillus ferrooxidans* que reaccionan con NAD⁺ y NADP⁺ a velocidades comparables y, en un tercero a la mayoría de las G6PDH de origen animal, que presentan máxima actividad con

* Trabajo subvencionado con una Ayuda de Investigación de la Fundación Juan March.

¹ Dirección actual: Farmacia Militar; Santiago de Compostela.

² Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, Madrid - 3.

NADP⁺ y baja variable con NAD⁺ y algunos análogos del NAD⁺ y del NADP⁺. La oxidación de la G6P en el hígado de mamíferos es catalizada por dos proteínas, que difieren en la localización subcelular (una se encuentra en la fracción soluble y otra en la mitocondria) y en la especificidad respecto a los nucleótidos y a otros sustratos distintos a la G6P (21); esta especificidad es más amplia para la enzima mitocondrial, llamada por esa razón «hexosa-fosfato-deshidrogenasa», en contraste con la G6PDH soluble. La enzima mitocondrial es probablemente idéntica a la G6PDH descrita por otros autores (1, 10).

En el presente trabajo se investiga la presencia de ambas formas enzimáticas en el hepatopáncreas de mejillón, órgano evolutivamente muy distanciado del hígado de los mamíferos, el cual desempeña en los lamelibranquios las funciones homólogas a las del hígado en los animales superiores. Por otra parte, se realiza un estudio cinético de la acción de diversas sustancias sobre la actividad catalítica de la G6PDH del citosol.

Particularmente se ha comprobado el efecto que ejerce la fructosa-difosfato (FDP) sobre la citada actividad, puesto que este metabolito inhibe fuertemente a la 6-fosfo-gluconato-deshidrogenasa (6PGDH) de hepatopáncreas de mejillón (3) e hígado de oveja (6).

Material y métodos

Reactivos. Los productos químicos que se han utilizado procedían de diferentes firmas comerciales: Merck, Probus y similares, siendo de calidad reactivo de análisis. Coenzimas, sustratos y enzimas purificadas procedían de Sigma.

Material biológico. Se han utilizado mejillones procedentes de las rías gallegas suministrados por una depuradora industrial de moluscos y mantenidos en el laboratorio, en acuarios con agua de mar

provistos de un circuito de aireación y de filtración.

Dissección del hepatopáncreas. Para realizar la disección de mejillones es necesario cortar el músculo aductor, separar las valvas, arrancar el pie con unas pinzas, cortar las dos tiras musculares superpuestas al hepatopáncreas, separar éste de las branquias con la punta de unas pinzas finas, extraer del hepatopáncreas el estilo cristalino y desprender el músculo.

Fraccionamiento celular. Se ha seguido la técnica descrita por TEAGUE y HENNEY (17) con ligeras modificaciones: 100 g de hepatopáncreas se suspenden en 900 ml de medio de extracción isotónico (Tris-ClH 10 mM, pH 7,5, sacarosa 0,5 M); se homogeniza y se centrifuga a 600 g durante 10 minutos; se desprecia el precipitado y se repite la operación. El sobrenadante se filtra y se vuelve a centrifugar a 9.000 g durante 10 min; su sobrenadante se considera la fracción citosólica y el precipitado la fracción mitocondrial, el cual se lava con el medio de extracción por sucesivas resuspensiones y centrifugaciones a 9.000 g durante 10 min hasta que no se encuentra actividad en el sobrenadante (aproximadamente en el 4.º ó 5.º lavado). El precipitado del último lavado se resuspende en una mínima cantidad de tampón (unos 20 ml), se homogeniza y se rompen las mitocondrias por ultrasonidos en períodos de 15 s, centrifugando posteriormente a 23.000 g durante 15 min, realizándose los ensayos enzimáticos en el sobrenadante.

Medida de la actividad de la G6PDH. Se ha usado la siguiente mezcla de reacción: imidazol, 50 mM, pH 7; Cl₂Mg, 10 mM; G6P, 1 mM; NADP⁺, 0,6 mM, y extracto enzimático, 0,1 ml, correspondiendo aproximadamente a 0,1 mg de proteína, en un volumen final de 1 ml. La reacción se pone en marcha por adición de G6P, registrándose el cambio de

D.O. a 340 nm frente a un testigo sin sustrato. El efecto inhibitor de algunos ésteres fosfóricos se comprueba añadiendo a las cubetas problema y testigo la sustancia a ensayar a la concentración 2 mM.

Perfil de la curva de pH y pH óptimo de actividad de la G6PDH citosólica. Se ha determinado la actividad específica de la enzima en un margen de pH de 6,5-9,5 a intervalos de aproximadamente 0,5 unidades de pH. Las soluciones tampón usadas han sido las siguientes: imidazol, 50 mM, pH 6,5, 7 y 7,6; Tris-ClH, 50 mM, pH 8 y 8,5, y glicocola-NaOH, 50 mM, pH 9 y 9,5.

Para la determinación de las actividades enzimáticas se cambia en cada caso la solución tampón de la mezcla de reacción y la de las soluciones madre de coenzima y sustrato, manteniéndose las concentraciones de saturación en la mezcla de reacción anteriormente indicadas. Otra serie de ensayos similar se ha realizado en presencia de FDP 1 mM.

Determinación de la constante de Michaelis y de inhibición de la G6PDH citosólica. Las constantes de Michaelis aparentes (K_m) para el sustrato y coenzima de la G6PDH y las constantes de inhibiciones (K_i) de las sustancias efectoras se determinan a pH 7 en condiciones de temperatura controlada, 25° C, entre unos límites de concentración de 5 a 200 μ M de G6P y NADP⁺.

Para la determinación de las K_i se realizan las curvas de progresión de la G6P o del NADP⁺, con intervalos de separación de 5 μ M para los puntos más bajos (hasta 25 μ M) y de 25 y 50 μ M para los siguientes, manteniendo en cada caso el otro sustrato (G6P o NADP⁺) constante y en condiciones de saturación. Paralelamente se realiza la curva de progresión en presencia de una concentración constante de inhibidor. Todas las determinaciones se han realizado añadiendo el posible efector a las cubetas (referencia y problema), con objeto de contrarrestar la acción de

algún posible artefacto que enmascare el efecto inhibitor.

Los resultados se representan por el método de los dobles recíprocos de LINEWEAVER-BURK (9).

Resultados

Distribución de la actividad G6PDH en diferentes fracciones celulares. Propiedades cinéticas de la G6PDH citosólica. Aunque se ha encontrado una ligera actividad G6PDH en la fracción mitocondrial (tabla I), prácticamente el total de la actividad enzimática se localiza en la fracción sobrenadante de 9.000 g (citosólica).

Tabla I. *Distribución intracelular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de hepatopáncreas de mejillón.*

La distribución porcentual de actividad entre la fracción citosólica y la mitocondrial se calcula considerando 100 % la suma de las actividades enzimáticas totales de ambas fracciones.

Fracción	Actividad específica (mu/mg proteína)	Distribución (% de actividad)
Citosol	0,0140 ± 0,001	99,42 ± 0,27
Mitocondrias	0,0128 ± 0,003	0,72 ± 0,27

La actividad específica de la G6PDH mitocondrial de hepatopáncreas resulta próxima a la citosólica. Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores con tejido hepático (13), tanto en lo referente a la distribución intracelular de la actividad, como a la alta actividad específica encontrada para la G6PDH mitocondrial. Esta forma exhibe doble especificidad coenzimática ante el NADP⁺ y el NAD⁺. La posibilidad de que pueda ejercer su función *in vivo* ha sido discutida anteriormente (20).

Perfil de la curva de pH y pH óptimo de actividad. El perfil de la curva de actividad presenta tres fases (fig. 1). Una zona correspondiente a los valores de pH bajos, en los que la actividad tiende a aumentar cuando se eleva el pH; otra co-

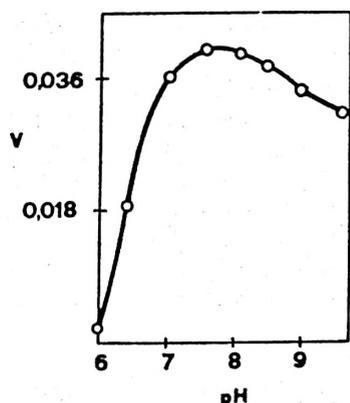


Fig. 1. Curva de pH-actividad y pH óptimo de actividad de la G6PDH citosólica de hepatopáncreas de mejillón.

respondiente a los valores de pH altos, en la cual las actividades tienden a disminuir, y una zona de valores de pH intermedios (próximos a la neutralidad) en la cual se encuentra el pH óptimo de la actividad enzimática. Algunos de los pH óptimos descritos para la G6PDH de diversos orígenes coinciden con el valor de pH obtenido en la G6PDH de hepatopáncreas. Así, ZAHEER *et al.* (21) describen un valor óptimo de pH 7,5 para la fracción sobrenadante de hígado de rata.

Determinación de las constantes cinéticas aparentes. Las K_m aparentes obtenidas para la G6PDH (20 μM) y para el NADP^+ (10 μM) coinciden sensiblemente con las determinadas previamente en extractos crudos de hepatopáncreas (14), y resultan próximos a los citados en la bibliografía para los mamíferos (12).

Acción inhibitoria del fosfoenol-piruvato. El fosfoenolpiruvato (PEP), descrito como inhibidor de la G6PDH de bacterias (18), cuya principal vía degradativa es la ruta de Entner-Doudoroff, ejerce un efecto inhibitorio sobre la G6PDH citosólica de hepatopáncreas de mejillón (fig. 2).

Se ha investigado la acción del PEP a concentración fija sobre las constantes cinéticas de la enzima, encontrándose una inhibición aparente de tipo no competi-

tivo según la representación gráfica de Lineweaver-Burk sobre la G6PDH con un valor de K_i 5,2 mM. Sin embargo, el PEP 1 mM no altera la K_m (NADP^+) de la enzima. Asumiendo que en el hepatopáncreas de mejillón los niveles celulares de equilibrio del PEP son del mismo orden que los descritos en el hígado de rata (8), el valor obtenido para la K_i (PEP) respecto al sustrato glucídico no parece ser indicativo de un efecto fisiológico.

Efecto de diversos ésteres fosfóricos. Se ha ensayado el efecto que ejercen diversos ésteres fosfóricos a concentraciones próximas a las fisiológicas (2 mM) sobre la actividad de la G6PDH citosólica, medida en condiciones de saturación de sustrato y coenzima. Se ha obtenido efecto inhibitorio con FDP (39 %) y pirofosfato (9 %) y no con fructosa-1-fosfato, glicerol-3-fosfato y ortofosfato.

Acción inhibitoria de la FDP. Se ha estudiado el efecto inhibitorio de concen-

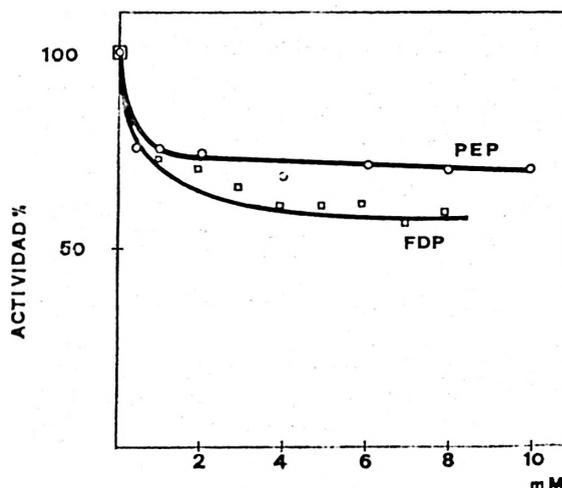


Fig. 2. Efecto de concentraciones crecientes de PEP y FDP sobre la actividad de la G6PDH del citosol de hepatopáncreas.

La mezcla de reacción contiene en un volumen de 2 ml: tampón Imidazol, 50 mM, pH 7; Cl_2Mg , 10 mM; G6P, 25 μM ; NADP^+ , 0,6 mM, y extracto enzimático (sobrenadante) correspondiente a 0,5-0,8 mg de proteína.

traciones crecientes de FDP sobre la actividad de la G6PDH a concentración de G6P próxima al valor de la K_m aparente (fig. 2), observándose que la inhibición aumenta hasta una concentración de FDP 4 mM, no aumentando en presencia de

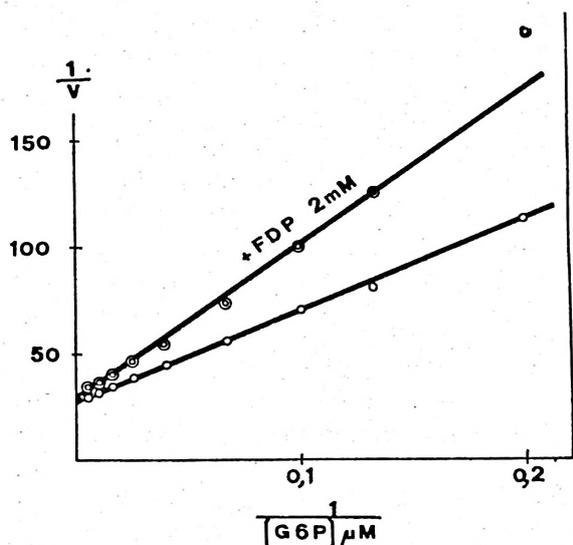


Fig. 3. Acción inhibitoria competitiva de la FDP sobre la actividad de la G6PDH del citosol de hepatopáncreas respecto a la G6P.

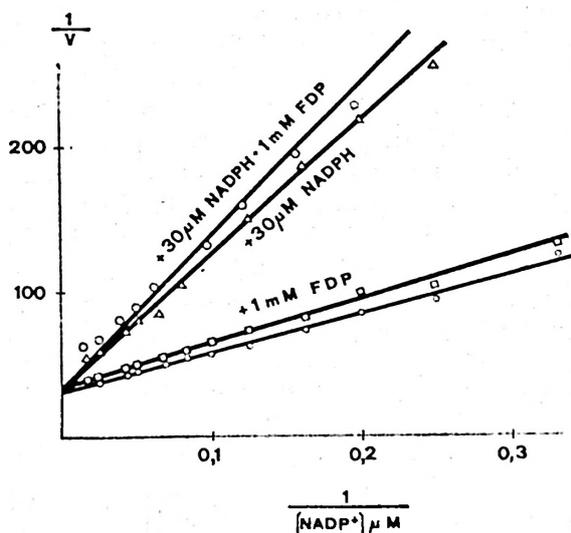


Fig. 4. Acción inhibitoria aislada y conjunta de la FDP y del NADPH sobre la actividad de la G6PDH citosólica de hepatopáncreas respecto al $NADP^+$.

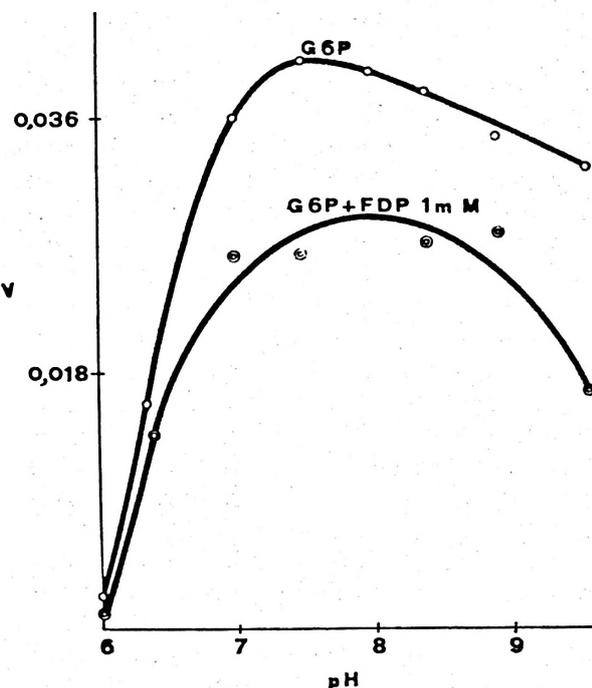


Fig. 5. Curva pH-actividad de la G6PDH del citosol de hepatopáncreas en ausencia y presencia de FDP.

concentraciones superiores de inhibidor.

Se ha determinado la K_i de la FDP respecto a la G6P, expresándose los resultados por el método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, obteniéndose una inhibición de «tipo competitivo» según el método gráfico empleado con un valor de K_i 3 mM (fig. 3) y un valor medio de K_i $3 \pm 1,3$ mM (5 determinaciones).

El efecto de la acción aislada y conjunta de la FDP y del NADPH muestra (fig. 4) que la presencia de la FDP no afecta la K_m para el $NADP^+$ y la K_i del NADPH.

Se ha considerado la influencia del pH sobre la acción inhibitoria de la FDP a concentración saturada de G6P y de $NADP^+$ en ausencia y presencia de FDP 2 mM (fig. 5), y se representan los resultados en unos límites de pH de 6 a 9,5, observándose un marcado paralelismo entre las curvas de pH.

Discusión

ZAHEER *et al.* (21) demostraron la existencia de G6PDH en mitocondrias de hígado de rata, comprobando que su actividad constituye una parte importante de la G6PDH soluble. Asimismo encontraron diferencias entre las propiedades cinéticas de las formas citoplasmática y soluble de la enzima.

SHIMENO y TAKEDA (13) estudiaron la distribución intracelular de la G6PDH en hígado de *Mugel cephalus*, demostrando que la actividad enzimática está principalmente localizada en la fracción soluble o citoplasmática, si bien hallaron actividad en la fracción mitocondrial.

De los resultados hallados en el hepatopáncreas de mejillón puede deducirse que, igual que en el mugel, la G6PDH se encuentra en su mayor parte en forma soluble, pero se detecta también actividad en la fracción mitocondrial, con una actividad específica comparable a la citosólica. Asimismo se ha demostrado que la G6PDH mitocondrial posee doble especificidad coenzimática para el NADP⁺ y el NAD⁺, a diferencia de la citosólica, que muestra especificidad sólo para el NADP⁺.

Puesto que la G6PDH es una enzima clave sometida a regulación a nivel de síntesis (4) que posiblemente limita el flujo carbonado en la ruta de las pentosas-fosfato, se ha realizado un estudio de las propiedades cinéticas de la enzima del citosol de hepatopáncreas de mejillón con objeto de completar la investigación realizada anteriormente en homogenados totales del tejido (14). Se ha comprobado que las constantes de Michaelis para el NADP⁺ y la G6P son prácticamente iguales a las obtenidas anteriormente (14). De los diversos compuestos fosforilados ensayados sobre la actividad de la enzima únicamente el PEP, pirofosfato y FDP inhiben la actividad de la G6PDH citosólica. El efecto inhibitorio del pirofosfato 2 mM en presencia de concentraciones de saturación de G6P y NADP⁺ es muy pe-

queño, por lo que puede descartarse la posibilidad de que ejerza algún efecto *in vivo*. Asimismo, la alta constante de inhibición encontrada para el PEP parece indicar que su efecto inhibitorio no puede tener repercusión fisiológica.

La FDP, descrita como activador alostérico de la piruvato-kinasa de músculo aductor de mejillón (5) y como inhibidor competitivo respecto al 6-fosfo-gluconato de la 6-fosfo-gluconato-deshidrogenasa (6PGDH) purificada de hígado de oveja (6), ejerce también una potente inhibición sobre la 6PGDH de hepatopáncreas de mejillón (3).

Basándose en lo anterior, SILVA-PANDO (15) ha sugerido que, en el hepatopáncreas de mejillón, la FDP puede contribuir a controlar el flujo carbonado entre la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis, superponiendo su acción a la que ejerce el sistema NADP⁺/NADPH (3). Debido a que la concentración de equilibrio de la FDP se eleva al aumentar el flujo glucolítico (16), la posible acción inhibitoria sobre la ruta de las pentosas-fosfato resultaría más eficaz en aquellas situaciones fisiológicas en las que la demanda energética está cubierta y el flujo carbonado de la glucólisis se utiliza en la biosíntesis lipídica.

La acción inhibitoria de la FDP sobre la 6PGDH de hepatopáncreas podría reforzarse si este metabolito ejerciese algún efecto inhibitorio sobre la G6PDH en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la K_i encontrada (3 ± 1,3 mM) está muy lejos de los límites de fluctuación de la concentración celular de la FDP en hepatopáncreas (3,2 ± 1,8 μM en condiciones de ayuno del mejillón; 5,6 ± 3,4 μM en condiciones de lipogénesis) encontradas en este laboratorio (2).

Por otra parte, las curvas de actividad en función del pH de la G6PDH citosólica en presencia y ausencia de FDP muestran una simetría indicativa de que el pH afecta de igual manera a la actividad catalítica de la enzima y a la acción inhi-

bidora de la FDP, lo cual sugiere un efecto a nivel de centro activo. La acción que ejercen la FDP y el NADPH, aislada y conjuntamente, sobre la actividad de la enzima respecto al NADP⁺ (fig. 4) excluye la posibilidad de que la inhibición de la FDP se base en una analogía estructural entre esta sustancia y parte de la molécula del NADP⁺.

Las propiedades cinéticas de la forma enzimática predominante de la G6PDH de hepatopáncreas de mejillón indican la ausencia de un control a nivel de actividad parecido al existente en la enzima de otros orígenes (18), que pueda superponerse al estrecho control que ejerce el sistema redox NADP⁺/NADPH (7). Estos resultados realzan la importancia del control a nivel de síntesis de la enzima que sugiere la variación estacional de actividad observada (4).

Agradecimientos

A M. Torre-Cervigón, A. M. Pérez-Camacho y G. Román-Cabello, por su asesoramiento para el mantenimiento de los mejillones en el laboratorio y su generosa donación de acuarios. A L. Losada-Lago, que ha proporcionado el material biológico y el agua de mar utilizados en la presente investigación.

Resumen

El 99,42 % de la actividad total de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa de hepatopáncreas de mejillón se localiza en la fracción sobrenadante (citosólica). Se ha solubilizado una forma mitocondrial de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa que exhibe doble especificidad coenzimática ante el NAD⁺ y el NADP⁺.

Se ha investigado el efecto inhibitorio de algunos compuestos fosforilados sobre la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa citosólica y se han determinado las constantes de inhibición de la fructosa-1,6-difosfato y del fosfoenol-piruvato, respecto al sustrato glucosa-6-fosfato. En la enzima citosólica se ha realizado asimismo la

curva pH-actividad en presencia y ausencia de fructosa difosfato. Finalmente, se ha determinado el porcentaje de inhibición en función de la concentración de fructosa difosfato a concentraciones constantes de los sustratos y el efecto inhibitorio producido simultáneamente por la fructosa difosfato y el NADPH.

Bibliografía

1. BEUTLER, E. y MORRISON, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 5289-5293, 1967.
2. CAMESELLE, J. C., CARRIÓN-ANGOSTO, A. y RUIZ-AMIL, M.: *VI Congreso SEB*, Sevilla, 1967. Res. 176.
3. CARRIÓN-ANGOSTO, A., SILVA-PANDO, M. y RUIZ-AMIL, M.: *9th Meeting FEBS*, Budapest, p. 48.
4. CIENFUEGOS, J. E. y CARRIÓN-ANGOSTO, A.: *XII Journées Biochim. Latines*, Burdeos, 1976, p. 27.
5. DE ZWAAN, A. y HOLVERDA, D. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 430-433, 1972.
6. DYSON, J. E. D. y D'ORAZIO, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 5428-5435, 1973.
7. EGGLESTON, L. V. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **138**, 425-435, 1974.
8. LAGUNAS, R., MCLEAN, P. y GREENBAUM, A. L.: *Eur. J. Biochem.*, **15**, 179-190, 1970.
9. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
10. METZGER, R. P., WILCOX, S. S. y WICK, A. N.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2767-2771, 1965.
11. OLIVE, C., GEROCH, M. E. y LEVY, H. R.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2047-2057, 1971.
12. SAPAG-HAGAR, M., LAGUNAS, R. y SOLS, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 179-185, 1973.
13. SHIMENO, S. y TAKEDA, M.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 461-466, 1973.
14. SILVA-PANDO, M., CARRIÓN-ANGOSTO, A. y RUIZ-AMIL, M.: *XIII Reunión SEB*, Madrid, 1974, p. 76.
15. SILVA-PANDO, M.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Santiago de Compostela, 1976.
16. TAKEDA, K., KANESHIGE, Y. y KOSAKA, K.:

- 7th Inter. Congress. Biochem., Tokio, 1957. Abs. 842-b.
17. TEAGUE, M. W. y HENNEY, H. R.: *J. Bacteriol.*, 116, 673-684, 1973.
18. TUNAEL, N. y SCHLEGEL, H. G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 1554-1560, 1972.
19. VEECH, R. L., EGGLESTON, L. V. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, 115, 609-619, 1969.
20. WOOD, W. A. y SCHWERDT, R. F.: *J. Biol. Chem.*, 206, 625-635, 1954.
21. ZAHEER, N., TEWARI, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 120, 22-34, 1967.