

- 7) DAVIDSON, E. A. (1959).—Specificity of pyruvate kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **33**: 238.
- 8) FITZGERALD, D. K.; BRODBECK, V.; KIYOSAWA, I.; MAWAL, R.; COLVIN, B., y EBNER, K. E. (1970).—Lactalbumin and the Lactose Synthetase Reaction. *J. Biol. Chem.*, **245** (8): 2103-2108.
- 9) KLEE, W. A., y KLEE, C. B. (1972).—The interaction of α -lactalbumin and the A protein of lactose synthetase. *J. Biol. Chem.*, **247** (8): 2336-2344.
- 10) PALMITER, R. D. (1969).—Properties of Lactose Synthetase from Mouse Mammary Gland: role of a proposed third component. *Biochim. Biophys. Acta.* **178**: 35-46.

CATEDRA DE TECNOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS

(Prof. Dr. JUSTINO BURGOS GONZALEZ)

α -DICARBONILO REDUCTASA DE HIGADO DE PALOMA: 1) CINETICA DE LA REDUCCION DEL PIRUVATO DE ETILO CON NADPH COMO COENZIMA

Por J. González Prieto
A. Bernardo
R. Martín Sarmiento
I. Vidal

INTRODUCCION

BERNARDO y sus colaboradores² han aislado recientemente, a partir de hígado de paloma, una α -dicarbonilo reductasa [L (+) - α -hidroxicarbonilo: NAD (P) óxido reductasa], similar a la descrita inicialmente por PROVECHO *et al.*¹² en hígado de bóvido. Este enzima había venido siendo considerado una diacetilo reductasa específica^{7, 8}, pero los estudios de especificidad efectuados por los autores mencionados pusieron de manifiesto que, además del diacetilo, reduce todo tipo de α -dicarbonilos de más de tres átomos de C, entre ellos el piruvato de etilo, a los correspondientes L (+)- α -hidroxicarbonilos utilizando como donador de hidrógeno NADH o NADPH.

El presente artículo da cuenta de las experiencias realizadas para determinar el mecanismo de reacción y las constantes de afinidad del enzima en la reducción del piruvato de etilo con NADPH.

MATERIAL Y METODOS

El NADPH fue obtenido de Boehringer, el piruvato de etilo de Sigma, el lactato de etilo de Merck y la pentano-3-ona de Spectrix. La acetona (Panreac) fue purificada siguiendo el método descrito por VOGEL (1964).

Las preparaciones enzimáticas se obtuvieron según el método descrito por BERNARDO y col.²

Las determinaciones de actividad se efectuaron espectrofotométricamente a partir del descenso en absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del coenzima en un medio termostataado a 25°C y tamponado a pH 6,1 con fosfato

An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 343-353.

bisódico monopotásico 0,1 M. En este trabajo, «v» se refiere a velocidad inicial, expresada como nmoles de sustrato reducidos por minuto.

Para la determinación de los parámetros cinéticos se midieron las actividades iniciales a cuatro concentraciones distintas de cada uno de los dos sustratos, piruvato de etilo y NADPH. El cálculo de K_s y K_m se llevó a cabo por el método de Hanes en lugar del de Lineweaver-Burk, por su mayor precisión^{1, 11}; K_s^{NADPH} se obtuvo representando (NADPH)/v en función de las distintas molaridades de NADPH, lo que proporcionó una serie de rectas, una para cada concentración de piruvato de etilo, cuyo punto de corte en el segundo cuadrante corresponde a $-K_s$. La representación secundaria de las pendientes de estas rectas en función de la inversa de la concentración de piruvato de etilo correspondiente dio una nueva recta, cuyo punto de corte sobre el eje horizontal corresponde a $-1/K_m$, de donde se dedujo el valor de K_m para el piruvato de etilo. Del mismo modo, al representar (piruvato de etilo)/v en función de (piruvato de etilo), la familia de rectas obtenidas determinó el valor de $K_s^{\text{etil-piruvato}}$ y de la representación secundaria se obtuvo el correspondiente valor de K_m^{NADPH} .

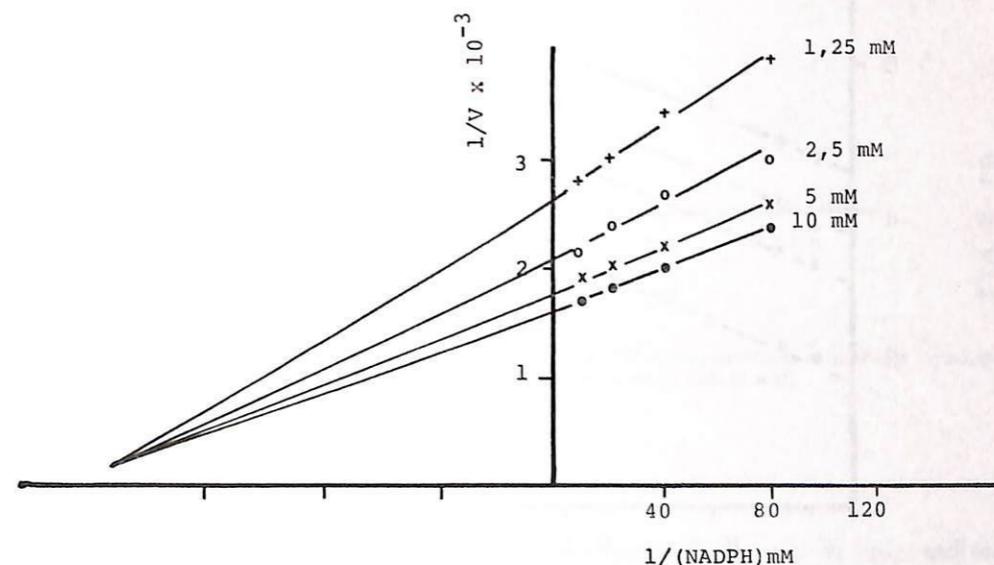
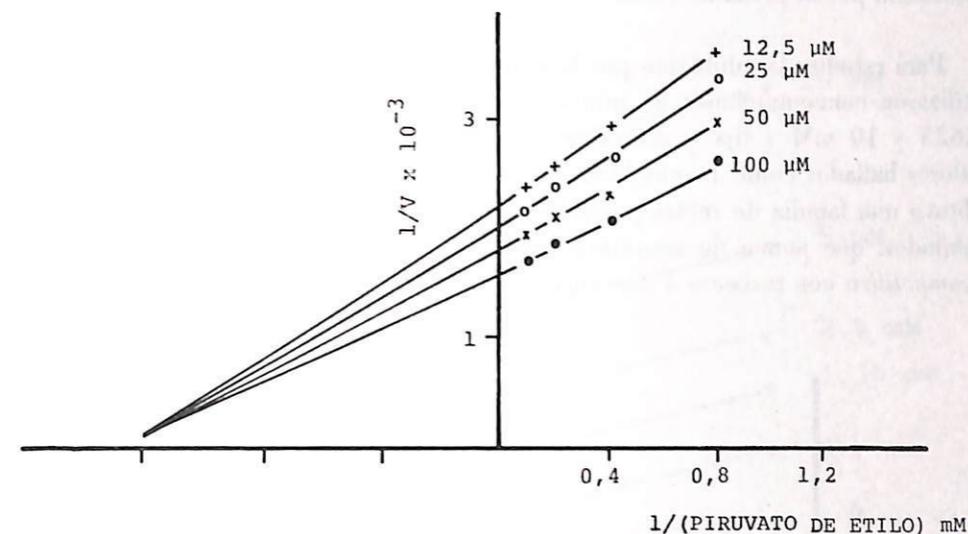
Los experimentos para calcular las constantes de inhibición fueron realizados a concentración fija y saturante de uno de los sustratos y variable del otro y del inhibidor. Representando (S)/v en función de (S) se obtuvo una serie de rectas, una para cada concentración de inhibidor; la representación secundaria de las pendientes de estas rectas (en el caso de las inhibiciones no competitivas y acompetitivas) o de las intersecciones (en el de las inhibiciones competitivas) en función de (I) determinó otra recta, cuyo punto de corte sobre el eje de abscisas corresponde a $-K_i$. La constante de inhibición para el piruvato de etilo en la zona en que aparece inhibición por exceso de este sustrato se calculó representando la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración del mismo y tomando como K_i la recíproca, cambiada de signo, del punto de corte en el eje de abscisas de la recta obtenida. Para la presentación de los resultados en el presente artículo se ha utilizado la tradicional representación de Lineweaver-Burk, por considerar que resulta más comprensible para no especialistas en cinética enzimática que la de Hanes.

RESULTADOS

Influencia de la concentración de piruvato de etilo y NADPH sobre la velocidad de reacción

La representación de la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de piruvato de etilo o NADPH muestra que la reacción sigue una cinética michaeliana en todo el rango de molaridad estudiado. En estudios previos de la influencia de la concentración de sustratos sobre la velocidad de reacción pudo comprobarse también que la linealidad se mantiene al menos

entre 5 y 200 μM de NADPH y entre 40 μM y 10 mM de piruvato de etilo. Las constantes de afinidad para esta zona han sido estimadas en: $K_s^{\text{etil-piruvato}} = 0,6$ mM, $K_m^{\text{NADPH}} = 4$ μM (figs. 1a y 1b), $K_m^{\text{etil-piruvato}} = 1,1$ mM y $K_m^{\text{NADPH}} = 6,7$ μM .



Figuras 1a y 1b.—Representaciones primarias de $1/v$ en ausencia de inhibidores en función de $1/(\text{sustrato})$. Las concentraciones expresadas en la figura, al lado de cada línea, se refieren al sustrato fijo variable (NADPH en 1a y piruvato de etilo en 1b).

A concentraciones de piruvato de etilo por encima de 10 mM se observa que la velocidad de reacción disminuye cuando aumenta la molaridad del mismo, revelando la existencia de inhibición por exceso de sustrato: la K_i para el piruvato de etilo en este tramo es de 100 mM.

Inhibición por la pentano-3-ona

Para estudiar la inhibición por la pentano-3-ona frente al piruvato de etilo se utilizaron concentraciones de inhibidor entre 1.25 y 5 mM, del sustrato entre 0,625 y 10 mM y fija y saturante de NADPH (100 μ M). Representando los valores hallados como 1/velocidad inicial en función de 1/(piruvato de etilo) se obtuvo una familia de rectas paralelas (fig. 2), una para cada concentración del inhibidor, que ponen de manifiesto que la inhibición por la pentano-3-ona es *acompetitiva* con respecto a este sustrato.

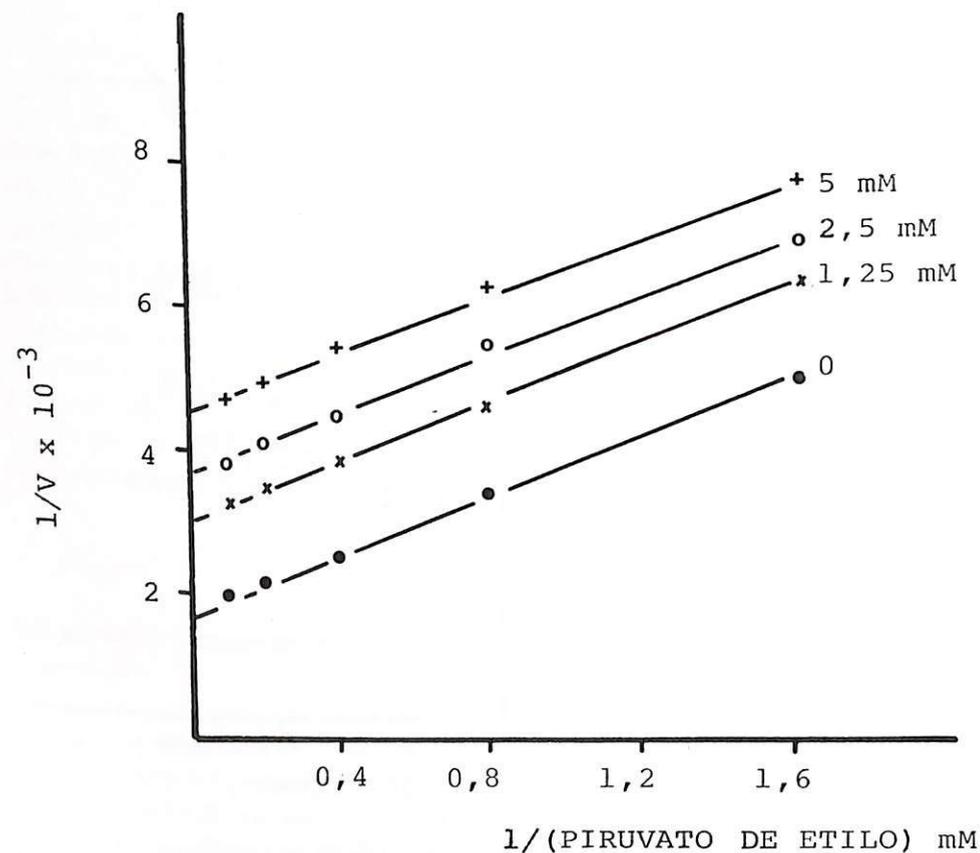


Figura 2.—Inhibición por la pentano-3-ona a las concentraciones indicadas, respecto al piruvato de etilo. Concentración de NADPH (100 μ M).

El comportamiento frente al NADPH se estudió a concentración fija y no saturante del piruvato de etilo (2 mM) y variable entre 100 y 6,25 μ M del coenzima y entre 1.25 y 5 mM de la pentano-3-ona. La representación de los resultados demostró, como en el caso anterior, que la inhibición es *acompetitiva* (figura 3). $K_i^{\text{Pentano-3-ona}}$ ha sido estimada en 6,5 mM.

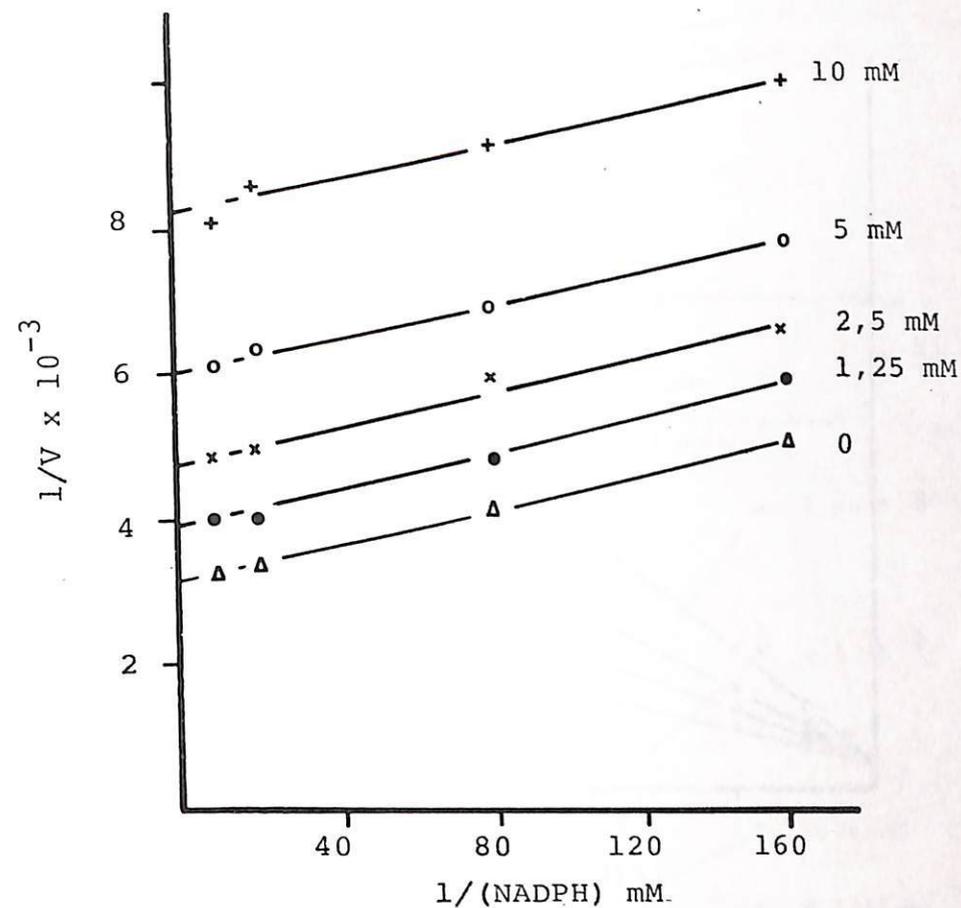


Figura 3.—Inhibición por la pentano-3-ona respecto al NADPH. Concentraciones de inhibidor expresadas en la gráfica. Concentración del piruvato de etilo (2 mM).

Inhibición por la acetona

La inhibición producida por la acetona frente al piruvato de etilo, utilizando concentraciones de acetona entre 50 y 400 mM es *competitiva*, como demuestra la convergencia sobre el eje vertical de la serie de rectas obtenidas (fig. 4). La inhibición frente al NADPH, siguiendo el mismo procedimiento utilizado al

inhibir con pentano-3-ona frente al coenzima, resultó de tipo *acompetitivo* (figura 5). K_i^{Acetona} resultó ser de 130 mM.

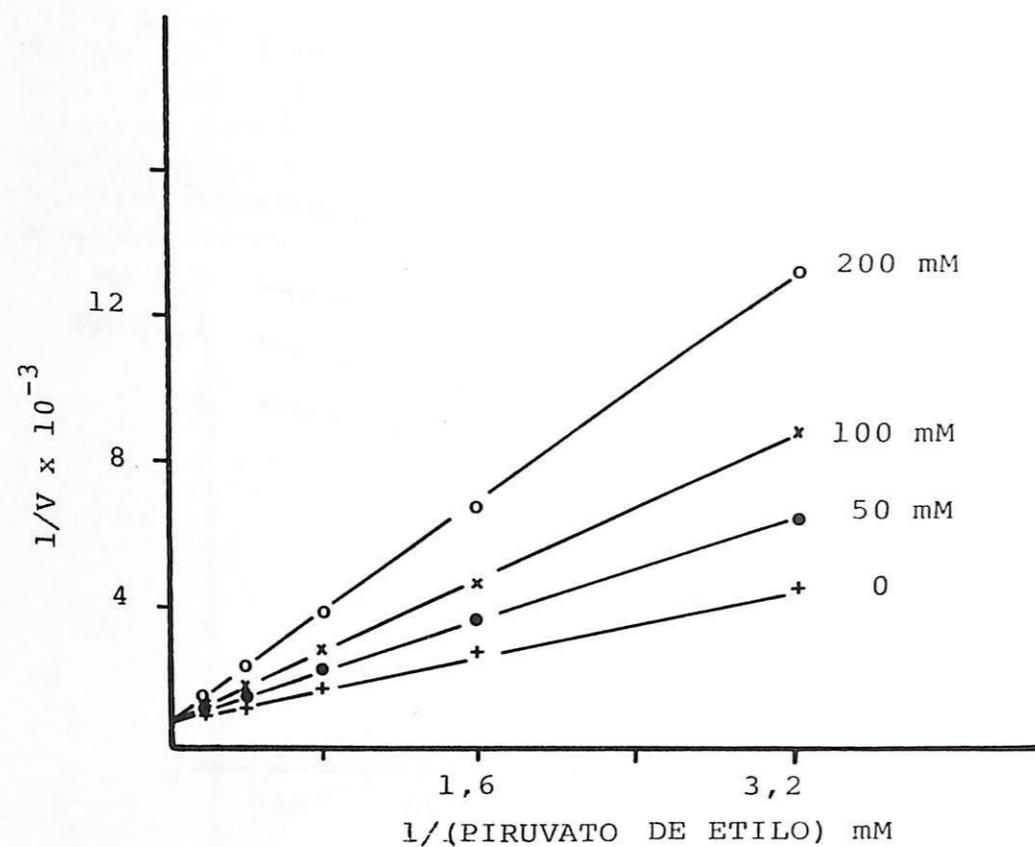


Figura 4.—Patrón de inhibición por la acetona frente al piruvato de etilo a las concentraciones indicadas de inhibidor. Concentración de NADPH: 100 μ M.

Patrón de inhibición por los productos

A concentración fija y saturante del piruvato de etilo (10 mM) y variable del coenzima (entre 6,25 y 100 μ M) se obtiene, inhibiendo con NADP (entre 0,125 y 1 mM), una serie de rectas que se cortan sobre el eje vertical, poniendo de manifiesto que se trata de una inhibición *competitiva* (fig. 6).

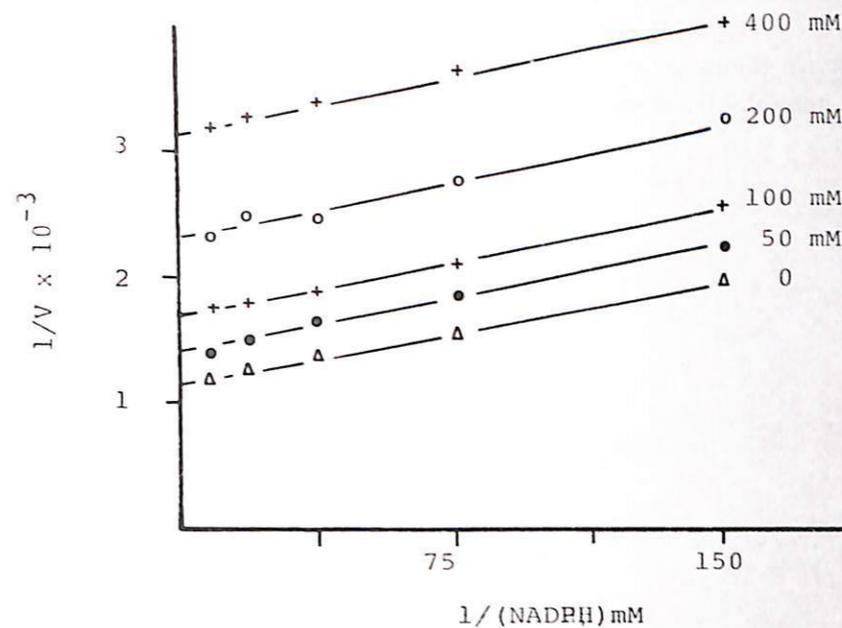


Figura 5.—Inhibición por la acetona frente al NADPH. Concentración de piruvato de etilo: 2 mM. Concentración de acetona, las expresadas en la gráfica.

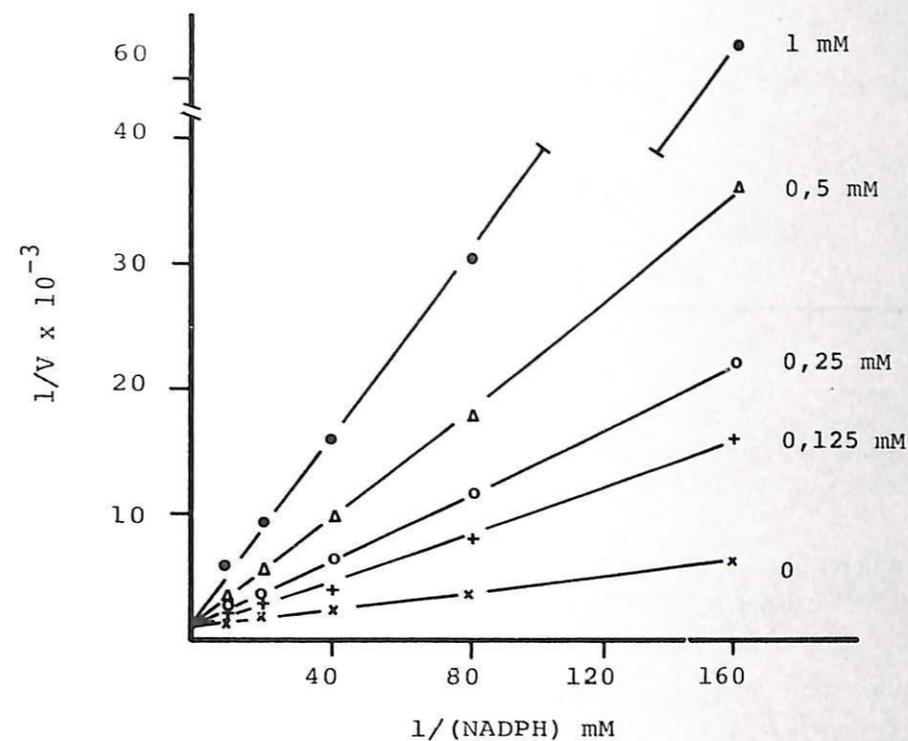


Figura 6.—Inhibición por el NADP con NADPH como sustrato variable, a las concentraciones de inhibidor indicadas. Concentración del sustrato fijo, piruvato de etilo: 10 mM.

La inhibición frente al carbonilo por el correspondiente glicol (lactato de etilo, entre 1,5 y 12 mM) con NADPH fijo y saturante dio una familia de rectas (figura 7), cuyo punto de corte en el segundo cuadrante pone de manifiesto que se trata de una inhibición *no competitiva*.

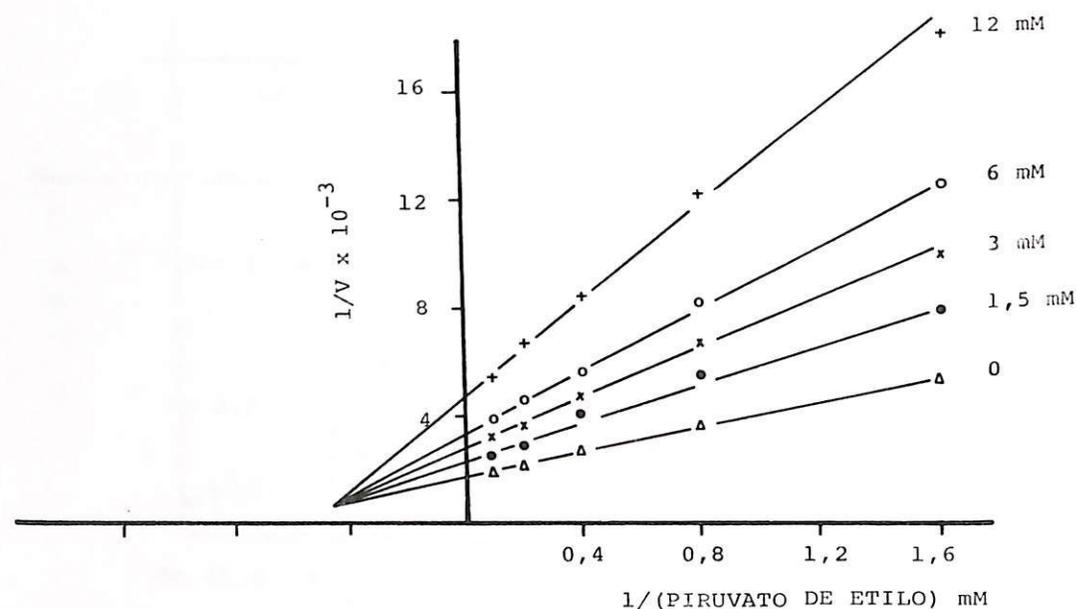


Figura 7.—Inhibición, a las concentraciones indicadas en la gráfica, por el lactato de etilo. Sustrato fijo. NADPH: 100 μ M.

Los valores de K_i obtenidos en estos experimentos fueron los siguientes: $K_i^{\text{lactato de etilo}} = 4 \text{ mM}$ y $K_i^{\text{NADPH}} = 70 \text{ } \mu\text{M}$.

DISCUSION

Para el diagnóstico del mecanismo de reacción de la reducción del piruvato de etilo por el NADPH catalizada por la α -dicarbonilo reductasa de hígado de

paloma se ha partido de los siguientes datos: a) la forma de las representaciones de la inversa de la velocidad en ausencia de inhibidores en función de la inversa de la concentración de sustrato a que corresponde (figs. 1a y 1b); b) el patrón de inhibición por la pentano-3-ona y la acetona, dos monocarbonilos que pueden ser considerados análogos estructurales de los dicarbonilos que el enzima acepta como sustratos a reducir; c) el patrón de inhibición por los productos de la reacción, NADP y lactato de etilo.

La convergencia de las rectas de las figs. 1a y 1b pone de manifiesto que se sigue un mecanismo secuencial, descartando los sistemas ping-pong, y su linealidad que, de los secuenciales, quedan también eliminados los esquemas al azar de equilibrio lento, que deberían dar representaciones no lineales^{4, 6, 10}. Restan pues en discusión el Ordenado Bi-Bi, el de Theorell-Chance, el al azar de equilibrio rápido y sus respectivos «Iso» mecanismos (para nomenclatura, véase CLELAND¹).

Por otra parte, la pentano-3-ona inhibe la reacción acompetitivamente para ambos sustratos. De acuerdo con las normas de CLELAND para inhibidores de vía muerta⁵, este patrón pone de manifiesto que dicha cetona se fija exclusivamente a formas del enzima distintas de aquellas a las que lo hacen el NADPH y el piruvato de etilo; es decir, a E-NADP, a E-lactato de etilo o a ambas. En consecuencia, cabe destacar también los mecanismos al azar de equilibrio rápido, en los que, por ser la etapa limitante de la velocidad la interconversión de los complejos ternarios^{4, 9, 10}, la concentración de estado estacionario de las formas del enzima que siguen a éstas en la secuencia de reacción (en nuestro caso, E-NADP y E-lactato de etilo) es, a efectos prácticos, cero. Así pues, la reacción sigue un esquema de orden obligatorio de fijación de los sustratos, sea Ordenado Bi-Bi o Theorell-Chance, con o sin isomerización de las formas estables del enzima.

Para decidir a partir de estudios de inhibición por los productos cuál de los cuatro mecanismos aún posibles sigue la reacción, es preciso identificar previamente al sustrato conductor del sistema, el primero en fijarse al enzima. La inhibición por la acetona resultó ser competitiva para el piruvato de etilo, lo que, por aplicación de las ya citadas normas de CLELAND⁵, pone de manifiesto que reacciona con la misma forma del enzima con la que lo hace este compuesto y únicamente con ella. Como la fijación de un inhibidor de vía muerta en una forma del enzima distinta de aquella a la que se fija el sustrato variable sólo modifica la pendiente de las gráficas si la forma en cuestión está situada en la secuencia de reacción delante de la de adición del mencionado sustrato⁵, la inhibición de la acetona respecto al NADPH debería resultar no competitiva, con efectos sobre la pendiente, si el orden de fijación al enzima fuese piruvato de etilo-NADPH y acompetitiva, sin ellos, de ser NADPH-piruvato de etilo. Los datos obtenidos por nosotros mostraron que la inhibición es acompetitiva y, por tanto, que el NADPH es el primer sustrato en incorporarse al enzima.

El NADP inhibe la reacción competitivamente para el NADPH. Siendo éste el sustrato conductor, tal patrón es incompatible con los dos mecanismos «Iso» aún en discusión^{4, 5}, que, por otra parte, son muy poco frecuentes (los autores no conocen ningún caso en que hayan sido demostrados de forma concluyente), y deja como únicos posibles el de Theorell-Chance y el Ordenado Bi-Bi. Finalmente, el lactado de etilo inhibe a su sustrato de procedencia no competitivamente, lo que descarta el esquema de Theorell-Chance.

Se concluye, por tanto, que la reducción con NADPH del piruvato de etilo catalizada por la α -dicarbonilo reductasa de hígado de paloma sigue un mecanismo Ordenado Bi-Bi, en el que el NADPH opera como sustrato conductor. un sistema bastante habitual en reacciones catalizadas por oxidoreductasas. Para la reducción del diacetilo con NADH por este mismo enzima se ha propuesto un mecanismo de Theorell-Chance, también con el coenzima como primer sustrato en fijarse³. Esta conclusión no es incompatible con la sugerida aquí, puesto que los dos mecanismos difieren únicamente en que en el de Theorell-Chance la concentración de estado estacionario de los complejos ternarios es prácticamente cero, por ser las constantes de velocidad de disociación de los mismos mucho más altas que las de su formación^{10, 13}. Dado que el valor alcanzado por estas constantes cuando un enzima acepta varios sustratos alternativos es distinto (salvo por azar) para cada una de las reacciones catalizadas, cabe perfectamente en lo posible que un mismo enzima siga uno u otro mecanismo dependiendo de los compuestos que está utilizando.

La reacción sigue una cinética michaeliana normal en un amplio rango de concentraciones de piruvato de etilo y NADPH, pero a molaridades altas del primero aparece inhibición por exceso de sustrato. El significado biológico de este fenómeno, que ya había sido observado en la reducción del diacetilo por este mismo enzima³, se desconoce.

RESUMEN

La reacción sigue una cinética michaeliana normal en el rango de 40 μ M a 10 mM de piruvato de etilo y de 50 a 200 μ M de NADPH. En esta zona, la convergencia de las rectas en las representaciones primarias de 1/v en función de 1/(S) y los patrones de inhibición por la Pentano-3-ona y la acetona y por los productos de la reacción demostraron que la reducción del piruvato de etilo por la α -dicarbonilo reductasa de hígado de paloma con NADPH sigue un mecanismo Ordenado Bi-Bi con el coenzima como sustrato conductor.

A concentraciones de piruvato de etilo por encima de 10 mM se ha encontrado inhibición por exceso de sustrato.

Se han calculado también las constantes de afinidad para la reacción.

α -DICARBONYL REDUCTASE FROM PIGEON LIVER: 1) KINETICS OF ETHYL PIRUVATE REDUCTION WITH NADPH AS COENZYME

SUMMARY

Reactions shows a Michaelis-Menten kinetics in the range 5-200 μ M NADPH and 40 μ M - 10 mM ethyl pyruvate. In this range, convergence of the primary plots of 1/v versus 1/(S) and the patterns of inhibition by pentane-3-one and acetone and by the reaction products, showed that the α -dicarbonyl reductase from pigeon liver catalyzes the reduction of ethyl pyruvate by NADPH following an Ordered Bi-Bi mechanism with the coenzyme as the leading substrate.

Inhibition by the substrate was observed at ethyl pyruvate concentrations higher than 10 mM.

Affinity constants for the reaction have been calculated too.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ATKINS, G. L., y NIMNO, I. A. (1975).—A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, **149**: 775-777.
- 2) BERNARDO, A.; GONZÁLEZ PRIETO, J., y MARTÍN SARMIENTO, R. (1984).—Further purification and characterization of diacetyl reductase from pigeon liver. *Int. J. Biochem.* En prensa.
- 3) BURGOS, J.; MARTÍN, R., y DíEZ, V. (1974).—Pigeon liver diacetyl reductase kinetic and thermodynamic studies with NADH as coenzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **364**: 9-16.
- 4) CLELAND, W. W. (1963a).—The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (I) nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**: 104-137.
- 5) CLELAND, W. W. (1963b).—The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: (III) predictions of initial velocities and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**: 188-196.
- 6) CLELAND, W. W. (1970).—Steady State Kinetics. En *The Enzymes*. 3.º Ed. Pg. 1-65. Paul D. Boyer. Academic Press, New York and London.
- 7) COMITÉ DE NOMENCLATURA DE LA I.U.B. (1980).—«Enzyme Nomenclature, 1978». pgs. 1-26, 28 y 38. Academic Press, London.
- 8) DíEZ, V.; BURGOS, J., y MARTÍN, R. (1974).—Pigeon liver diacetyl reductase: purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **350**: 253-262.
- 9) DIXON, M., y WEBB, E. C. (1964).—*Enzymes*, 2.º Ed. Pgs. 70, 82, 84-87, 203, 204, 205 y 369. Longmans, London.
- 10) MAHLER, H. R., y CORDES, E. H. (1963).—*Química Biológica*. Pgs. 255-257. Ed. Omega, Barcelona.
- 11) MARTÍN, R., y BURGOS, J. (1979).—A new method for determining enzyme kinetic constants. *An. Fac. Vet. León*, **25**: 295-307.
- 12) PROVECHO, F.; BURGOS, J., y MARTÍN SARMIENTO, R. (1984).—Further purification and characterization of diacetyl reducing enzymes from beef liver. *Int. J. Biochem.* En prensa.
- 13) THEORELL, H., y CHANCE, B. (1951).—Citado en CLELAND (1963a).
- 14) VOGEL, A. (1964).—*Practical organic chemistry*, 3.º Ed. Pgs. 171-172. Longmans, London.