

Comparación estructural y funcional de las isozimas de la fosfoglicerato mutasa de mamífero.

F. Berrocal y J. Carreras.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
Casanova, 143, Barcelona, 36.

Introducción

Investigaciones de éste y otros laboratorios, mediante la modificación de aminoácidos, han puesto de manifiesto la posible implicación en el mecanismo de la fosfoglicerato mutasa (PGM) de residuos de cisteína, (Carreras *et al.*, 1982); histidina, (Carreras *et al.*, 1982); lisina, (Carne y Flynn, 1977) y arginina (Borders y Wilson, 1976). Los únicos estudios comparativos realizados entre las tres isozimas de la fosfoglicerato mutasa se refieren a la cisteína (Mezquita *et al.*, 1981; Bartrons y Carreras, 1982). Este trabajo tiene por objeto investigar el efecto que la modificación de los aminoácidos antes mencionados tiene sobre la actividad de las fosfoglicerato mutasas de mamífero tipos M, B y MB.

Métodos

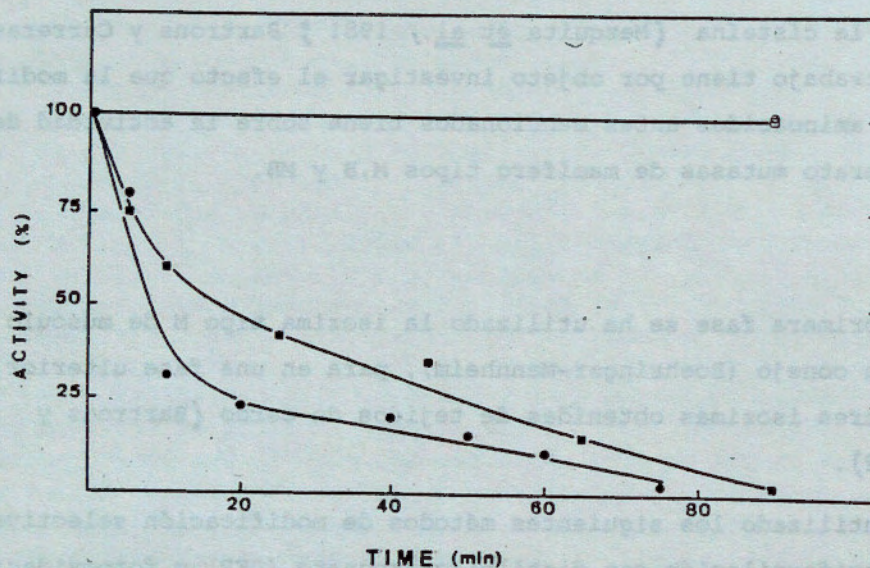
En una primera fase se ha utilizado la isozima tipo M de músculo esquelético de conejo (Boehringer-Mannheim), para en una fase ulterior estudiar las tres isozimas obtenidas de tejidos de cerdo (Bartrons y Carreras, 1982).

Se han utilizado los siguientes métodos de modificación selectiva. Histidina: etoxiformilación con dietilpirocarbonato (DEP) y fotooxidación con rosa de bengala (RB). Lisina: tratamiento con trinitrobenzenosulfonato (TNBS) y piridoxal 5'fosfato (P-5-P). Argininas: tratamiento con dicetonas (2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona) y con derivados de glioxal (metilglioxal y fenilglioxal).

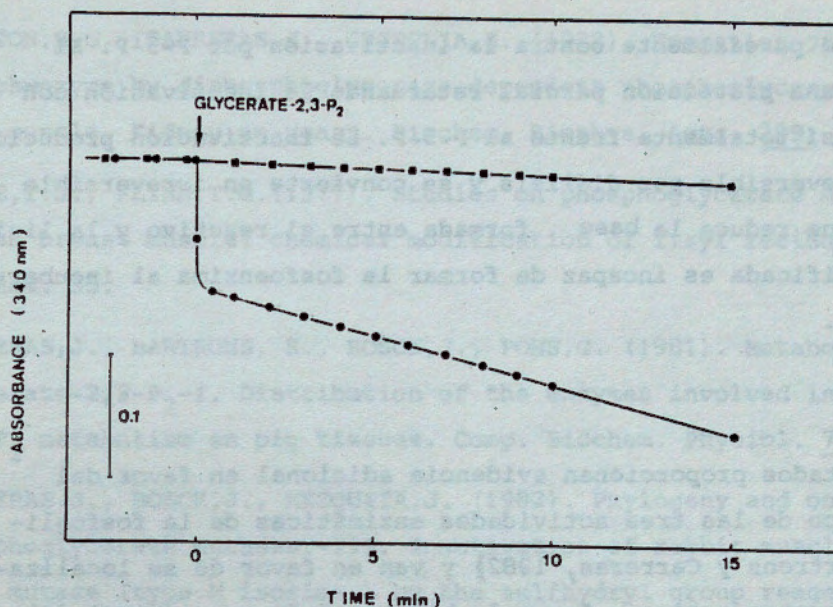
A tiempos progresivos de tratamiento de la enzima se han medido las tres actividades enzimáticas de la fosfoglicerato mutasa: fosfoglicerato mutasa (PGM); 2,3-bisfosfoglicerato sintasa (BPGS) y 2,3-bisfosfoglicerato fosfatasa (BPGP). Se han utilizado las técnicas previamente descritas, (Carreras *et al.*, 1981). Se ha estudiado también la capacidad de la enzima para formar la fosfoenzima a partir del cosustrato 2,3-bisfosfoglicerato (Britton *et al.*, 1972).

ResultadosModificación de residuos de arginina:

El tratamiento de la PGM con dicetonas y con derivados del glicoxal- produce la pérdida progresiva de la actividad enzimática principal y de las dos actividades colaterales. La incubación ulterior con hidroxilamina, que regenera los residuos de arginina modificados, reactiva las tres actividades. El sustrato (glicerato-3-P) y el cosustrato (glicerato 2,3-P₂) protegen contra la inactivación. La enzima inactivada es incapaz de formar la fosfoenzima intermediaria en el mecanismo de acción cuando se incuba con el cofactor. (Berrocal y Carreras, 1983).



{ La representación gráfica superior corresponde a la pérdida de actividad PGM de la fosfoglicerato mutasa de músculo esquelético de conejo al ser tratada con metilglicoxal (■) y con fenilglicoxal (●). }



[La representación gráfica superior corresponde a la formación de la fosfoenzima intermediaria al incubar el enzima con el cosustrato con la enzima nativa (●) y tratada con 2,3-butanodiona (■). La caída inicial corresponde a la formación de la fosfoenzima y la pendiente suave a su hidrólisis.]

Modificación de residuos de histidina:

El tratamiento de la PGM con DEP y la fotooxidación con RB ocasionan la pérdida progresiva de las tres actividades del enzima; las actividades sintasa y fosfatasa son menos afectadas que la actividad mutasa. El sustrato y el cosustrato protegen contra la inactivación por DEP, pero no protegen contra la inactivación producida por la fotooxidación. El tratamiento con hidroxilamina reactiva la enzima etoxiformilada. La enzima inactivada es incapaz de formar la fosfoenzima a partir del cosustrato. (Berrocal y Carreras, 1983)

Modificación de residuos de lisina:

La incubación de la PGM con TNBS y P-5¹P determina una pérdida progresiva y paralela de las actividades PGM, BPGS, BPGP; con el P-5¹P la inactivación no alcanza el 100%. Experimentos de titulación demuestran que la enzima inactiva al haberse modificado unos tres moles de lisina por mol de enzima. El cosustrato no protege frente a la inactivación

con TNBS y protege parcialmente contra la inactivación por P-5[↓]P. El sustrato produce una protección parcial retardando la inactivación con TNBS y protege casi totalmente frente al P-5[↓]P. La inactivación producida por el P-5[↓]P es reversible por diálisis y se convierte en irreversible al añadir NaBH₄, que reduce la base formada entre el reactivo y la lisina. La enzima modificada es incapaz de formar la fosfoenzima al incubarse con el cosustrato.

Conclusiones

Estos resultados proporcionan evidencia adicional en favor del carácter intrínseco de las tres actividades enzimáticas de la fosfoglicerato mutasa (Bartrons y Carreras, 1982) y van en favor de su localización en el mismo centro activo. Apoya la hipótesis de que a nivel del centro activo de la fosfoglicerato mutasa existen dos subcentros de unión separados para los monofosfogliceratos y los bisfosfogliceratos (Rose, 1980); Sasaki y Chiba, 1978), y sugieren la posible participación de residuos de arginina, histidina y lisina en el mecanismo de acción.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por la CAICYT. F. Berrocal es becario de la Fundación Pedro y Pons.

Bibliografía

- BARTRONS, R., CARRERAS, J. (1982). Purification and characterization of phosphoglycerate mutase isozymes from pig heart. *Biochim. Biophys. Acta* 708, 167-177.
- BERROCAL, F., CARRERAS, J. (1983). Metabolism of glicerato-2,3-P₂ III. Arginine-specific reagents inactivate the phosphoglycerate mutase, glicerato-2,3-P₂ synthase and glicerato-2,3-P₂ phosphatase activities of rabbit muscle phosphoglycerate mutase. (En prensa).
- BERROCAL, F., CARRERAS, J. (1983). Metabolism of glicerato-2,3-P₂-V. Histidine-specific reagents inactivate the phosphoglycerate mutase, glicerato-2,3-P₂ synthase and glicerato-2,3-P₂ phosphatase activities of rabbit muscle phosphoglycerate mutase. Pendiente de aceptación.
- BORDERS, C.L., WILSON, B.A. (1976). Phosphoglycerate mutase has essential arginyl residues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 73, 978-984.

- BRITTON, H.G., CARRERAS, J., GRISOLIA, S. (1972). Formation of an active phosphoenzyme by diphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase from muscle, Kidney and yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 289, 311-322.
- CARNE, T.J., FLYNN, T.G. (1977). Studies on phosphoglycerate mutase from chicken breast muscle: chemical modification of lysyl residues. *Can J. Biochem.* 55.
- CARRERAS, J., BARTRONS, R., BOSCH, J., PONS, G. (1981). Metabolism of glycerate-2,3-P₂-I. Distribution of the enzymes involved in the glycerate-2,3-P₂ metabolism in pig tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 708, 477-485.
- CARRERAS, J., BOSCH, J., MEZQUITA, J. (1982). Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases.-III. Inactivation of rabbit muscle phosphoglycerate mutase (type M isozyme) by the sulfhydryl group reagents. *Comp. Biochem. Physiol.* 71, 57-69.
- CARRERAS, J., MEZQUITA, J., PONS, G. (1982). Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases.-V. Inactivation of the phosphoglycerate mutase isozymes by histidine specific reagents. *Comp. Biochem. Physiol.* 728, 401-407.
- ROSE, Z.B. (1980). The enzymology of 2,3-bisphosphoglycerate. *Adv. Enzymol.* 51, 211-253.
- SASAKI, R., CHIBA, M. (1978). Functions of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. *Current topics in cellular regulation.* 14, 75-116.