

Comparació estructural dels isoenzims de la fosfoglicerat mutasa i de la glicerat-2,3-P<sub>2</sub> sintasa/fosfatasa de mamífer.

A.Tauler i J.Carreras.

Departament de Bioquímica. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona  
Casanova,143. Barcelona 36.

Introducció

En el teixit de mamífer s'han detectat dos grups d'isoenzims multifuncionals que mostren activitats 2,3-bisfosfoglicerat sintasa, 2,3-bisfosfoglicerat fosfatasa i fosfoglicerat mutasa: tres isoenzims de la fosfoglicerat mutasa (PGM) i tres de la bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa (BPGS - BPGP) (Carreras et al., 1981). Solament els isoenzims presents en les eritròcits humanes han siguts estudiats comparativament. (Rose, 1980; Chiba i. Sasaki, 1978). Aquest treball té per objecte la comparació estructural dels isoenzims de la BPGS - BPGP i de la PGM de teixits de porc.

Aïllament

Els dos isoenzims de la BPGS - BPGP de cervell de porc (isoenzims II i III) han estats purificats seguint un procés que inclou les següents etapes fonamentals: fraccionament salí amb sulfat amònic (45-75%), cromatografia d'hidroxiapatita, cromatografia de bescanvi iònic (DEAE - Sephadex A-50), cromatografia d'afinitat (Cibacron blue Sepharose). (fig. 1-4).

La purificació de l'isoenzim de muscle esquelètic (isoenzim I) inclou: fraccionament salí amb amònic (45-75%), cromatografia de gel filtració (Sephadex G-100), cromatografia de bescanvi iònic (DEAE-Sephadex A-50) i cromatografia d'afinitat (Cibacron blue Sepharose).

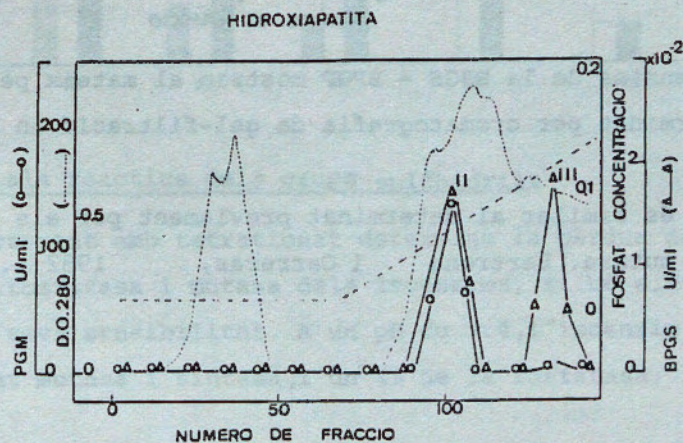


fig. 1



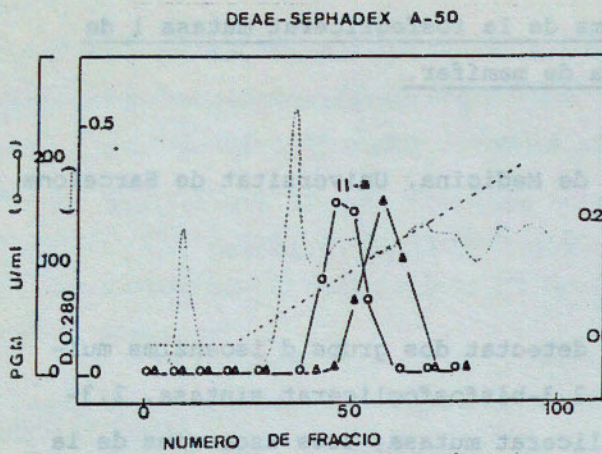


fig. 2

La preparació de múscul esquelètic és homogènia a l'anàlisi electroforètica en poliacrilamida amb SDS. Les del isoenzim de cervell no són pures, si bé estan lliures d'altres enzims contaminants amb activitats sintasa, fosfatasa, i mutasa.

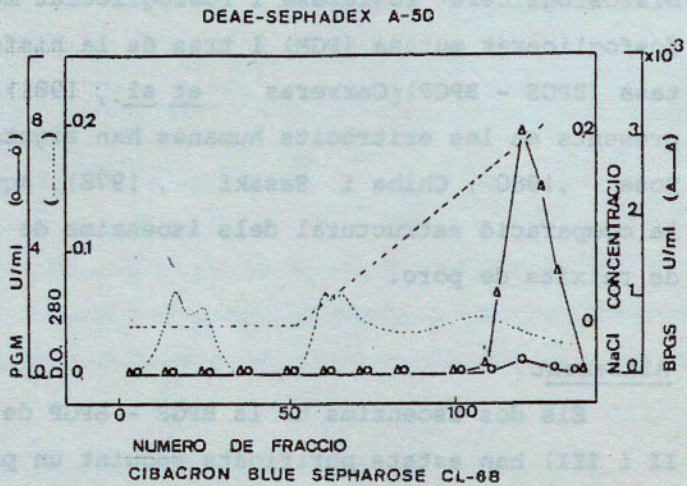


fig. 3

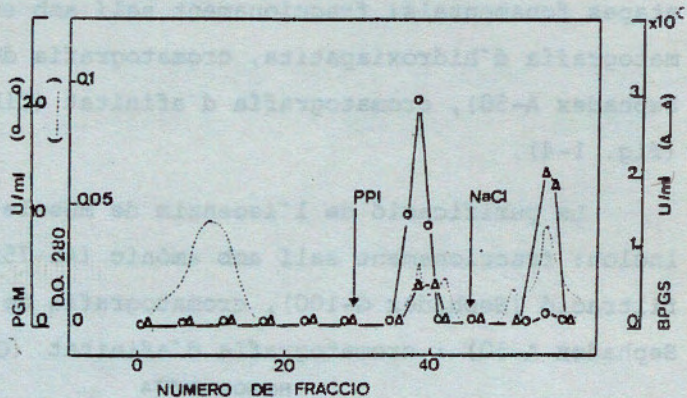


fig. 4

Pès molecular

Els tres isoenzims de la BPGS - BPGP mostren al mateix pès molecular ( 57.000 ) determinat per cromatografia de gel-filtració en Ultragel AC- 44. (fig. 5 ).

Aquest valor és similar al determinat prèviament per els isoenzims de la fosfoglicerat mutasa. (Bartrons i Carreras, 1982 ).



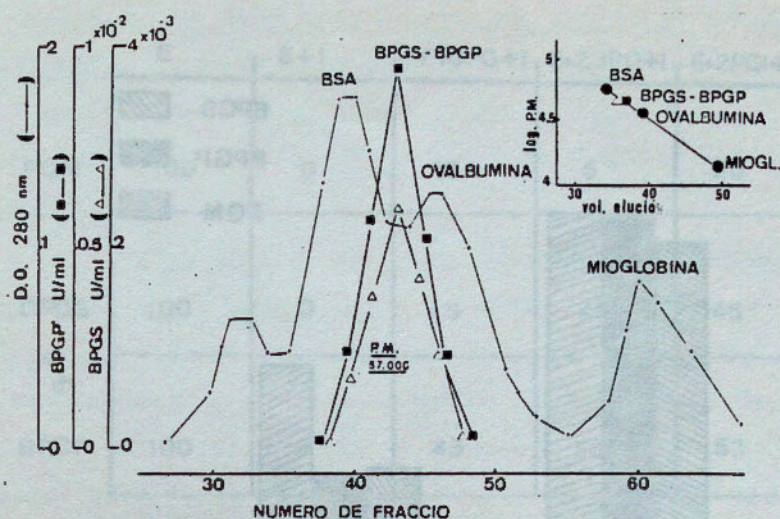


fig. 5

### Estabilitat tèrmica

Els tres isoenzims mostren diferent resistència a la calor. A un pH de 7.4 (tampó Tris-HCl 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM) i a una concentració de proteïna de 2.2 mg/ml, el isoenzim II s'inactiva totalment als 5 minuts d'incubació; els isoenzims I i III mantenen un 90% de l'activitat. (fig. 6).

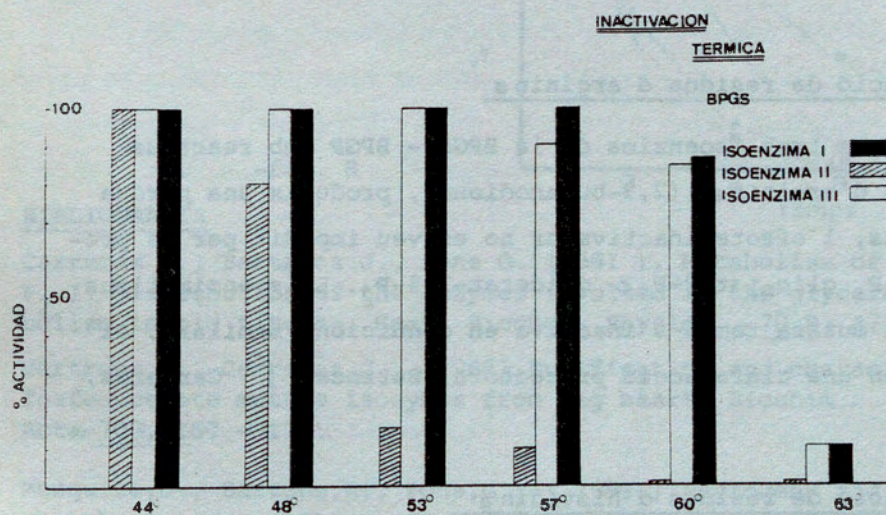


fig. 6

### Sensibilitat als reactius dels grups sulfhidrils

El tractament amb tetratióat determina la pèrdua de les activitats sintasa, fosfatasa i mutasa dels isoenzims, si bé els tres difereixen en la seva sensibilitat. A un pH de 7.4, l'isoenzim I perd un 6% de l'activitat mutasa i sintasa, i un 4% de la fosfatasa; l'isoenzim II perd un



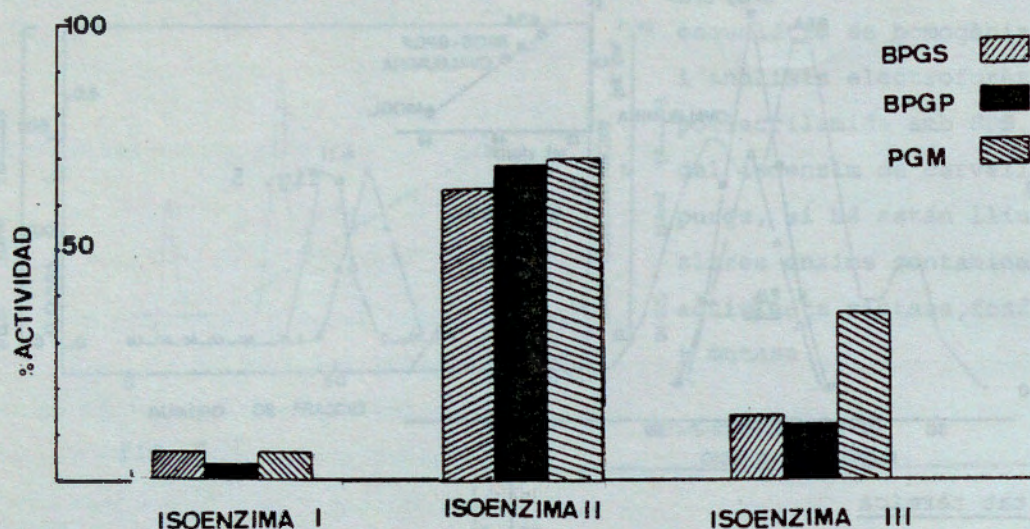


fig. 7

70% de mutasa , un 60% de sintasa i un 65% de fosfatasa]. Isoenzim III un 30% de mutasa, un 12% de sintasa i un 10% de fosfatasa. Els resultats previs havien demostrat que els isoenzims de la PGM difereixen per la seva sensibilitat als reactius del grups sulfhidrils. ( Carreras et al., 1981) (fig. 7).

#### Efecte de la modificació de residus d'arginina

El tractament dels tres isoenzims de la BPGS - BPGP amb reactius específics de residus d'arginina (2,3-butanodiona), produeix una pèrdua de les tres activitats; l'efecte inactivador no es veu impedit per la presència de glicerat-3-P, glicolat-2-P o glicerat-2,3-P<sub>2</sub>. L'isoenzim tipus M de la fosfoglicerat mutasa també s'inactiva en condicions similars, si bé els substrats tenen una clara acció protectora. (Berrocal i Carreras, 1983).

#### Efecte de la modificació de residus d'histidina

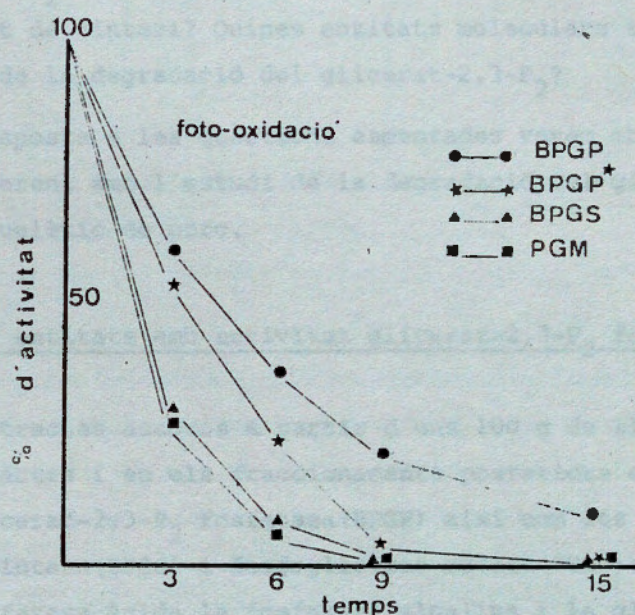
La incubació de l'isoenzim I amb dietilpirocarbonat i la fotooxidació amb Rosa de Bengala produeix la pèrdua de les tres activitats enzimàtiques, si bé l'activitat bisfosfoglicerat fosfatasa és molt més resistent al tractament (fig.8). Els substrats protegeixen en front al dietilpirocarbonat (taula I); el glicerat-1,3-P<sub>2</sub> és el que mostra l'efecte protector més gran. Resultats semblants s'han obtingut en l'isoenzim tipus M de la fosfoglicerat mutasa. ( Berrocal i Carreras, 1983 )



	E	E+I	E+3PG+I	E+2,3PG+I	E+2PGI+I	E+1,3PG+I
PGM	100	0	15	5	20	40
BPGS	100	0	45	45	45	70
BPGP	100	0	45	53	53	100

TAULA I

BPGP\*: activitat estimulada per el glicolat-2-P



-fig. 8

## BIBLIOGRAFIA

Carreras J., Bartrons J., Pons G. (1981). Metabolism of glycerate -2,3-P<sub>2</sub>. I. Distribution of the enzymes involved in the glycerate-2,3-P<sub>2</sub> metabolism in pig tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70 B, 477-485

Bartrons R., Carreras J., (1982) Purification and characterization of fosfoglycerate mutase isozymes from pig heart. *Biochim. et Biophys. Acta*, 708, 167 - 177.

Mezquita, J., Bartons, R., Pons, G., (1981) Phylogeny and Ontogeny of the phosphoglycerate mutase .II. Characterization of phosphoglycerate mutase isozymes from vertebrates by their thermal lability and sensitivity to the sulfhydryl group reagents. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70, 247-255.

Berrocal F., Carreras J., (1983). Comunicació.

Rose, Z.B. (1980). The enzymology of 2,3-bisfosfoglycerate. *Adv. Enzymol.* 51, 211-253.

Treball realitzat amb suport de C.A.I.C.Y.T.





Fig. 1. The effect of the concentration of the substrate on the activity of the enzyme. The activity was measured in the presence of 100, 200, and 300 units of substrate. The results show that the activity increases with the concentration of the substrate, reaching a maximum at 300 units.

Fig. 2. The effect of the concentration of the enzyme on the activity of the enzyme. The activity was measured in the presence of 100 units of substrate. The results show that the activity increases with the concentration of the enzyme, reaching a maximum at 100 units.

Fig. 3. The effect of the concentration of the cofactor on the activity of the enzyme. The activity was measured in the presence of 100 units of substrate and 100 units of enzyme. The results show that the activity increases with the concentration of the cofactor, reaching a maximum at 100 units.

Fig. 4. The effect of the concentration of the inhibitor on the activity of the enzyme. The activity was measured in the presence of 100 units of substrate and 100 units of enzyme. The results show that the activity decreases with the concentration of the inhibitor, reaching a minimum at 100 units.

Fig. 5. The effect of the concentration of the activator on the activity of the enzyme. The activity was measured in the presence of 100 units of substrate and 100 units of enzyme. The results show that the activity increases with the concentration of the activator, reaching a maximum at 100 units.