

Comparació funcional dels enzims amb activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa del múscul esquelètic de mamífer.

G.Pons i J.Carreras

Departament de Bioquímica.Facultat de Medicina.Universitat de Barcelona

Introducció

La majoria de treballs experimentals dedicats durant els últims quinze anys a l'estudi del metabolisme del glicerat-2,3-P₂ s'han fet quasi sempre amb eritròcit perquè és l'únic teixit que presenta concentracions importants d'aquest metabolit.A diferència de l'eritròcit,la situació en els altres teixits no sembla gaire clara.Com es poden explicar els baixos nivells de glicerat-2,3-P₂ en aquests teixits tot i que semblen gaudir d'una elevada capacitat de síntesi? Quines entitats moleculars són les autèntiques responsables de la degradació del glicerat-2,3-P₂?

Per tal de trobar resposta a les qüestions esmentades varem abordar un model experimental diferent amb l'estudi de la degradació del glicerat-2,3-P₂ en el múscul esquelètic de porc.

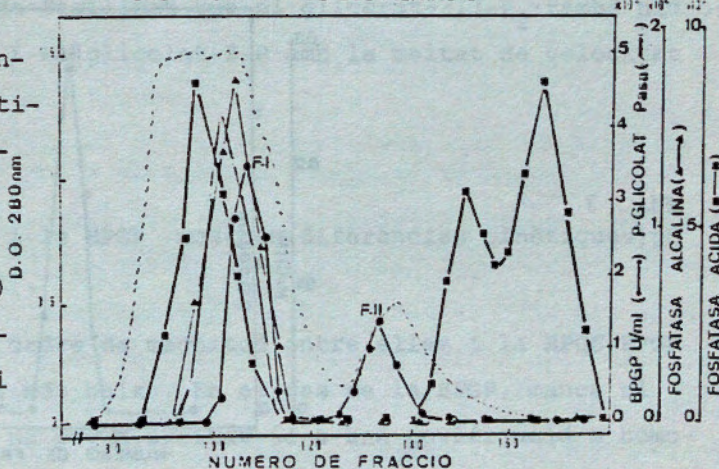
Desenvolupament experimental

1.- Aïllament de les entitats amb activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa

Es varen preparar extractes acuosos a partir d'uns 100 g de llom fresc de porc.En aquests extractes i en els fraccionaments posteriors es va determinar l'activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa(BPGP) així com les activitats bisfosfoglicerat sintasa(BPGS) i fosfoglicerat mutasa(PGM); també es varen determinar la fosfatasa àcida,la fosfatasa alcalina i la glicolat-2-P fosfatasa.Els extractes obtinguts varen ésser sotmesos a cromatografia de gel-filtració en Ultrogel AC-54 i cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-Sephadex A-50

La figura 1 mostra la presència de dues entitats amb activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa i pes molecular diferent.La primera(F-I;75% de l'activitat fosfatasa total) porta associada tota l'activitat fosfoglicerat mutasa i bisfosfoglicerat sintasa e-luïdes.La segona entitat

FIG. 1 CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRACIO



(F-II; 25% restant), manifesta exclusivament activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa.

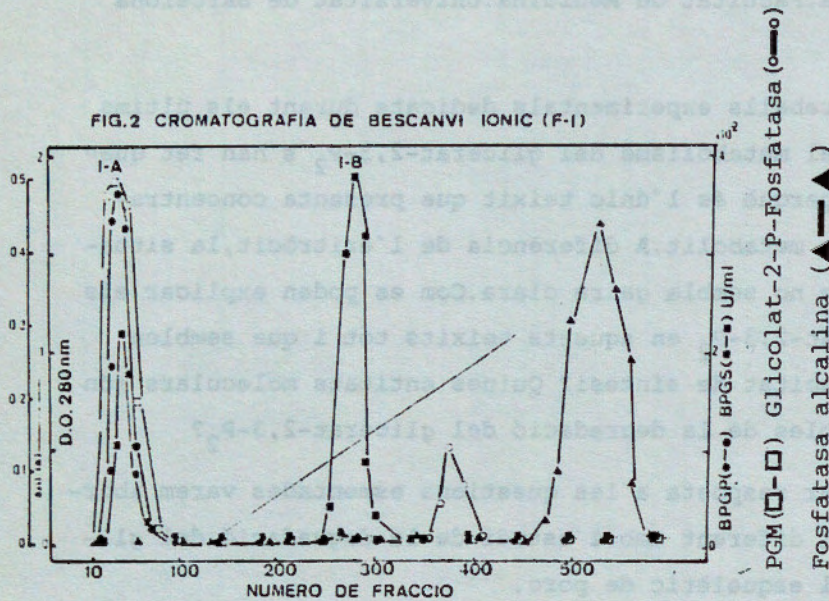


fig. 2

La F-I, sotmesa a bescanvi iònic en DEAE-Sephadex A-50 (fig. 2) es desdobra en dues entitats. Un enzim, que no s'arrapa al bescanviador, responsable de quasi la totalitat de l'activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa i de l'activitat fosfoglicerat mutasa eluïdes, així com d'un 40% de l'activitat bisfosfoglicerat sintasa; sembla correspondre a l'isoenzim M de la PGM. L'altre enzim, eluït amb el gradient de NaCl, molt minoritari en quant a l'activitat fosfatasa i mutasa, presenta una major proporció d'activitat sintasa; seria possiblement la forma isoenzimàtica de la BPGS - BPGP present al múscul esquelètic.

FIG.3 CROMATOGRAFIA DE BESCOANVI IONIC (F-II)

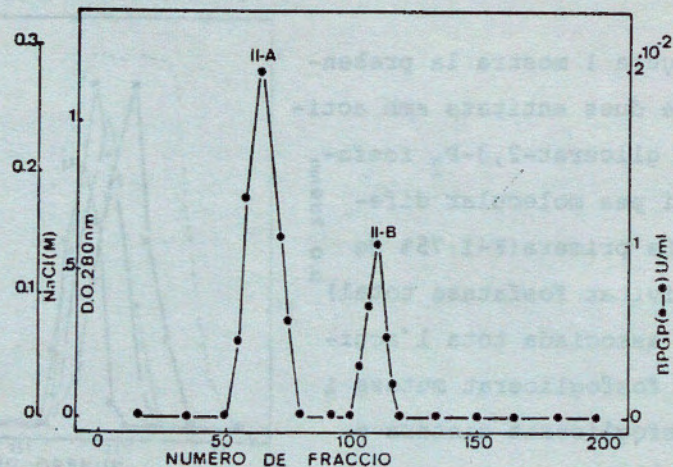


Fig. 3

L'anàlisi de la F-II per bescanvi iònic mostra l'existència de dues fraccions exclusivament amb activitat fosfatasa, corresponents als isoenzims de la BPGP.

La taula I resumeix els resultats obtinguts.

TAULA I Fraccions aïllades per gel -filtració i bescanvi iònic

| <u>Fraccions</u> | <u>Proporció d'activitats</u> | <u>% de l'activitat total</u> | | |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|-----|
| | BPGP/BPGS/PGM | BPGP | BPGS | PGM |
| F-IA (PGM) | 0.06/0.13/1.000 | 72 | 40 | 99 |
| F-IB (BPGS/BPGP) | 0.23/ 50/ 1.000 | 3 | 60 | 1 |
| F-IIA (BPGP) | ----- | 16 | -- | -- |
| F-IIB (BPGP) | ----- | 9 | -- | -- |

2.- Comparació funcional

A.- Activitat "en condicions iòniques intracel.lulars"

S'ha estudiat l'activitat de les diferents fraccions en el següent medi: fosfats potàsic/dipotàsic 100 mM, $Mg_2 Cl$ 10 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, pH 7.0

Els isoenzims de la BPGP perden un 94% de l'activitat; la PGM s'inhibeix en un 70% i la BPGS-BPGP manté l'activitat.

B.- Especificitat

L'estudi de l'activitat fosfatasa enfront de diferents substractes fosforilats revela diferents patrons: així, la BPGS/BPGP sembla ésser la més específica ja que únicament hidrolitza el glicerat-2,3- P_2 ; la PGM hidrolitza els monofosfoglicerats (3-PG i 2-PG) encara que amb una eficàcia molt menor respecte al glicerat-2,3- P_2 (15-20%). La BPGP hidrolitza el 2-PG amb la mateixa facilitat que el glicerat-2,3- P_2 ; també hidrolitza el fosfoenolpiruvat i el glicolat-2-P amb la meitat de velocitat que el glicerat-2,3- P_2 .

C.- Dades cinètiques

La PGM, la BPGS-BPGP i la BPGP mostren diferències cinètiques: pH òptim K_m i V_{max} . (taula II).

Les K_m difereixen un ordre de magnitud entre elles i la BPGS-BPGP és la que presenta un valor més baix. En el cas de la BPGP, manca el valor de la V_{max} perquè no ha pogut arribar-se a una purificació a homogeneïtat.

TAULA II Dades cinètiques

| <u>FRACCIO</u> | <u>pH OPTIM</u> | <u>km(M)</u> | <u>Vmax (Mols.Sus/Mol.Enz./min.)</u> |
|----------------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| PGM | 5 | $3 \cdot 10^{-4}$ | 2 |
| BPGS-BPGP | 5.2 | $6 \cdot 10^{-5}$ | 3 |
| BPGP | 6.0 | $8 \cdot 10^{-4}$ | - |

D.- Efecte dels productes; Activadors e inhibidors

S'han investigat els efectes dels monofosfoglicerat i del Pi (productes de la reacció) així com l'acció d'alguns ions inorgànics i de diversos anàlgs del sustrate. La taula III resumeix els resultats obtinguts.

TAULA III Efectes dels productes ; Activadors e inhibidors

| <u>Condicions</u> | <u>Fracció</u> | | |
|---|------------------|------------------------|-----------|
| | <u>I-A (PGM)</u> | <u>I-B (BPGS/BPGP)</u> | <u>II</u> |
| Control | 1 | 1 | 1 |
| Pi 100 mM | 0.3 | 1 | 0.06 |
| 3-PG 5 mM | 0.2 | 1 | 0.8 |
| Mg ₂ Cl 10 mM | 0.85 | 1 | 0.7 |
| NaCl 100 mM | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| Acetat sòdic 100 mM | 1 | 1 | 1 |
| Na ₂ SO ₃ 10 mM | 1 | 1 | 1 |
| Na ₂ SO ₃ 10 mM + Na Cl 100 mM | 0.4 | 2.1 | 0.2 |
| PPi 20 mM | 12 | 7 | 1 |
| Glicolat-2-P 2 mM | 30 | 50 | 1 |
| Glicina** 50 mM (pH 9) 20 | | 15 | 1 |

(** Respecte al control amb bicarbonat 50 mM, pH 9)

Conclusions

1.- En els extractes de múscul esquelètic s'han detectat quatre entitats moleculars amb activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa que corresponen possiblement a tres grups isoenzimàtics diferents. La primera (F-I A) seria l'isoenzim muscular (tipus M) de la fosfoglicerat mutasa (Bartrons; Carreras, 1982); la fracció I-B pertanyeria al grup dels isoenzims de la bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa (Sasaki *et al.*, 1975); Les fraccions II semblen correspondre als isoenzims de la bisfosfoglicerat fosfatasa (Narita *et al.*,

1979).

- 2.- Aquestes fraccions es troben en proporcions forçadiferents (taula I), i contribueixen en forma distinta a la hidròlisi del glicerat-2,3-P₂. L'activitat fosfatasa de la fosfoglicerat mutasa sembla ésser la majoritària.
- 3.- Les dades cinètiques no mostren grans diferències en els seus pH òptims. Les Km, en canvi, son distintes i podrien afectar a les proporcions donades a la taula I. Així, si considerem una concentració de glicerat-2,3-P₂ intramuscular de l'ordre de 100 μM es podria pensar (taula II) que l'únic enzim que treballa per sobre de la seva Km es la bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa. Fent uns càlculs molt aproximats podríem especular que l'activitat fosfatasa d'aquest últim enzim representa un 10 % de la capacitat hidrolítica total. La BPGP també veuria minvada la seva contribució en un 10%.
- 4.- L'efecte del Pi, present a altes concentracions en el medi intracel·lular, fortament inhibidor de l'activitat fosfatasa de la fosfoglicerat mutasa i de la bisfosfoglicerat fosfatasa (taula III), potenciaria encara més la contribució de la bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa a la hidròlisi del glicerat-2,3-P₂ i podria arribar a ésser d'un 30%.
- 5.- Es confirmen alguns efectes activadors clàssics (taula III) descrits a la literatura. Així, el P_i, el glicolat-2-P, el sulfit sòdic i la glicina són forts activadors de l'activitat fosfatasa de la PGM i de la BPGS-BPGP encara que en diferenta mesura i proporció. El seu valor fisiològic es dubtós.

Agraïments

Aquest treball ha sigut realitzat amb el suport de la CAICYT.

Bibliografia

- Bartrons R.; Carreras J. (1982) Purification and characterization of phosphoglycerate mutase isozymes from pig heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 70B, 167-177
- Chiba H; Sasaki R. (1978) Functions of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. *Curr. Top. in Cell. Reg.*, 14, 75-116
- Narita H; Utsumi S; Ikura K; Sasaki R; Chiba H. (1979) Comparative studies of the enzymes involved in 2,3-bisphosphoglycerate metabolism of rabbit erythrocytes and muscle cells. *Int. J. Biochem.* 10, 25-38
- Rose Z. B. (1980) The enzymology of 2,3-bisphosphoglycerate. *Advances in enzymol.* 51, 211-253
- Sasaki R; Ikura K; Sugimoto E; Chiba H. (1975) Purification of bisphosphoglyceromutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and phosphoglycerate mutase from human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 50, 581-593