

Estudi comparatiu de les característiques estructurals i funcionals
dels enzims multifuncionals implicats en el metabolisme del glicerat
2,3-bisfosfat.

Albert TAULER, Félix BERROCAL, Gabriel PONS i Josep CARRERAS.

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

Abstract

Structural and functional properties of phosphoglycerate mutase and
bisphosphoglycerate synthase/phosphatase isozymes.

Mammalian tissues contain six multifunctional enzymes with 2,3-bisphosphoglycerate synthase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and phosphoglycerate mutase activities. Three of them are the isozymes of phosphoglycerate mutase (E.C.2.7.5.3.), and the other have been interpreted as isozymes of the bisphosphoglycerate synthase/phosphatase found in erythrocytes. All these enzymes lose their activities when incubated with specific reagents for lysine (TNBS), arginine (phenyl glyoxal and 2,3-butanedione), histidine (diethyl pyrocarbonate and photo-oxidation with rose bengal) and cysteine (tetrathionate). The protective effect of glycerate-3-P and 2,3-bisphosphoglycerate differ with the reagents. 2,3-Bisphosphoglycerate synthase/phosphatase and phosphoglycerate mutase isozymes show similar kinetic patterns.

Introducció.

Dels teixits de mamífer s'han aïllat vuit enzims amb activitat bisfosfoglicerat sintasa ($1,3\text{-BPG} + 3\text{-PG} \longrightarrow 3\text{-PG} + 2,3\text{-BPG}$) i bisfosfoglicerat fosfatasa ($2,3\text{-BPG} \longrightarrow 3\text{-PG} + \text{Pi}$), que poden estar implicats en el metabolisme del glicerat 2,3-bisfosfat (2,3-BPG) (Carreras *et al.*, 1981; Chiba i Sasaki, 1978). Tres corresponen als isoenzims de la fosfoglicerat mutasa (PGM, tipus M, B, MB) (Mezquita i Carreras, 1981); altres tres han sigut interpretats com a isoenzims de la bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa (BPGS-BPGP) descrita en els eritròcits (Chiba i Sasaki 1978), i els dos restants com a possibles isoenzims de la bisfosfoglicerat fosfatasa (BPGP) detectada en el múscul esquelètic (Chiba i Sasaki, 1978).

Els tres isoenzims de la PGM han sigut copurificats fins homogeneïtat del múscul cardíac de porc (Bartrons i Carreras 1982). L'isoenzim tipus M ha estat també purificat del múscul esquelètic (Pons i Carreras 1983). Tenen fonamentalment activitat mutasa i en molt menys proporció activitats sintasa i fosfatasa (mutasa/sintasa/fosfatasa=1000/0.1/0.05).

Els tres possibles isoenzims de la BPGS-BPGP han estat purificats de múscul esquelètic i de cervell de porc (Pons i Carreras, 1983; Tauler i Carreras, 1983). La preparació de múscul és homogènia; les preparacions de cervell no ho són, si bé estan lliures d'enzims contaminants amb activitat bisfosfoglicerat sintasa, bisfosfoglicerat fosfatasa i fosfoglicerat mutasa. Tenen activitat sintasa i fosfatasa en més proporció que els isoenzims de la PGM (mutasa/sintasa/fosfatasa=1000/50/0.4).

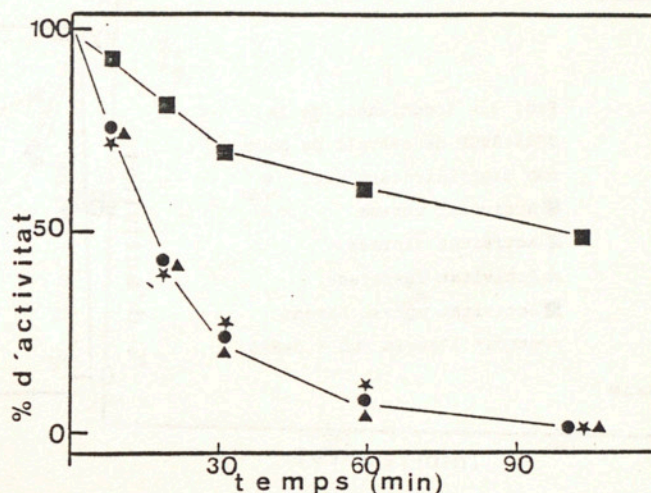
En aquest treball es presenten els resultats de l'estudi comparatiu de les característiques estructurals i funcionals dels isoenzims de la PGM i de la BPGS-BPGP, que completen els resultats prèviament publicats (Pons i Carreras, 1983; Tauler i Carreras, 1983; Berrocal i Carreras, 1983).

Aminoàcids essencials.

S'han investigat l'efecte que la modificació de residus de lisina, arginina, histidina i cisteïna té sobre les activitats bisfosfoglicerat sintasa, bisfosfoglicerat fosfatasa i fosfoglicerat mutasa dels isoenzims de la PGM i de la BPGS-BPGP. S'han estudiat comparativament els efectes protectors dels substrats, activadors i inhibidors. S'ha seguit la metodologia prèviament publicada (Carreras et al. 1982a, 1982b; Berrocal i Carreras, 1983b, 1983c, 1984).

Modificació de lisines.- Els tres isoenzims de la BPGS-BPGP mostren un comportament similar enfront el trinitrobenzè-sulfonat (TBNS); perden paral·lament les activitats bisfosfoglicerat sintasa, bisfosfoglicerat fosfatasa i fosfoglicerat mutasa (fig. 1). La concentració de reactiu necessària per inactivar l'enzim és d'un mateix ordre en tots els casos (50-100 μM /mg proteïna) a pH 8.2, 60 min. i 37°. Els substrats i productes no eviten la inactivació, si bé enlenteixen la seva velocitat. El 3-PG és el compost que té més efecte protector (fig. 1).

Fig. 1.- Inactivació de la BPGS-BPGP de cervell de porc amb TNBS. ● Activitat mutasa
 ✱ Activitat sintasa
 ▲ Activitat fosfatasa
 ■ Activitat mutasa havent protegit l'enzim amb 3-PG.



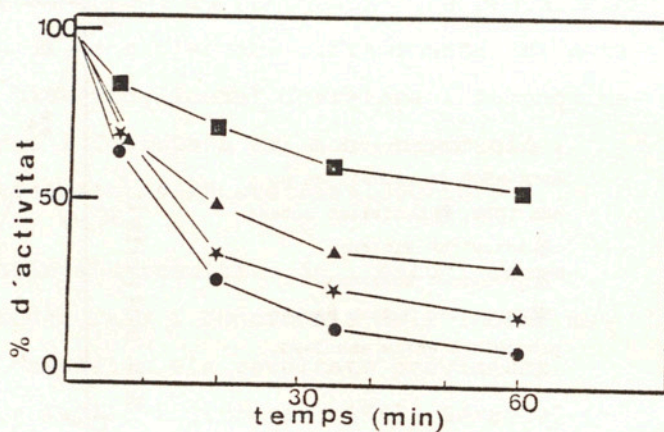
La incubació dels tres isoenzims de la PGM en presència de TNBS i de piridoxal-5'-P determina la pèrdua paral·lela de les activitats bisfosfoglicerat sintasa, bisfosfoglicerat fosfatasa i fosfoglicerat mutasa. No s'observen diferències significatives entre els dos isoenzims. Els efectes protectors dels substrats són similars als prèviament descrits per l'isoenzim tipus M de múscul de conill (Berrocal i Carreras, 1983a, 1984).

Modificació d'arginines.- El tractament dels tres isoenzims de la BPGS-BPGP amb fenilgloxal i 2,3-butanodiona afecta paral·lelament les tres activitats (fig. 2). Fenilgloxal (10-20 mM) i 2,3-butanodiona (10-20 mM) produeixen la inactivació total als 60' a pH 8.2 i 37°C. La presència de substrat o productes no modifica la inactivació (fig. 2).

Els tres isoenzims de la PGM són afectats pels reactius modificadors de residus d'arginina de manera similar a la publicada per l'isoenzim tipus M de múscul de conill (Berrocal i Carreras, 1983a, 1983b). Perden paral·lelament les tres activitats enzimàtiques; però a diferència dels isoenzims de la BPGS-BPGP, són protegits pel 3-PG i el 2,3-BPG.

Fig. 3.- Inactivació de la BPGS-BPGP de cervell de porc amb dietilpirocarbonat.

● Activitat mutasa
 ✱ Activitat sintasa
 ▲ Activitat fosfatasa
 ■ Activitat mutasa havent protegit l'enzim amb 1,3-BPG.



l'isoenzim MB de la fosfoglicerat mutasa.

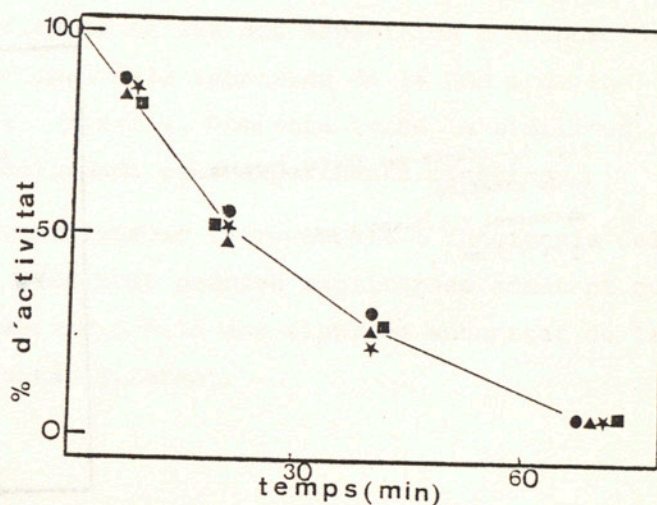
Característiques cinètiques.

Patrò cinètic.- S'han estudiat els patrons cinètics de l'activitat bisfosfoglicerat sintasa dels tres isoenzims de la BPGS-BPGP en un interval de 3-PG de $0.5 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$ i de 1,3-BPG de $0.5 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$ (pH 7.2, 28°, parada de la reacció per escalfament a 90°). El 1,3-BPG s'ha sintetitzat seguint essencialment el mètode de Krinski (1958). El 3-PG lliure de 2,3-BPG preparat segons el mètode de Towne (1957). El 2,3-BPG s'ha mesurat com a cosubstrat de la PGM segons Grisolia (1969).

Els tres isoenzims mostren un mateix patrò cinètic. Les representacions Lineweaver-Burk $1/V$ vs $1/3\text{-PG}$ a diferents concentracions de 1,3-BPG i de $1/V$ vs $1/1,3\text{-BPG}$ a diferents concentracions de 3-PG, donen gràfiques no lineals, la interpretació de les quals obliga a descartar possibles artefactes produïts per la presència de contaminants en la preparació dels substrats. Malgrat això no semblen existir diferències significatives entre les constants cinètiques dels tres isoenzims. Els

Fig. 2.- Inactivació de la BPGS-BPGP de cervell de porc amb 2,3-butanodiona.

● Activitat mutasa
 ★ Activitat sintasa
 ▲ Activitat fosfatasa
 ■ Activitat mutasa havent protegit l'enzim amb 1,3-BPG.



Modificació d'histidines.- Els isoenzims de la BPGS-BPGP purificats de cervell tenen, respecte als reactius modificadors d'histidines (dietilpirocarbonat i foto-oxidació amb rosa bengala) un comportament similar al de l'enzim de múscul esquelètic (Tauler i Carreras, 1983). S'inactiven les tres activitats, si bé l'activitat fosfatasa és més resistent.

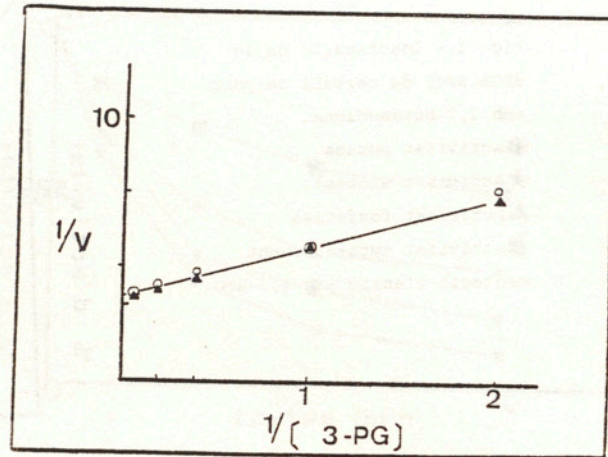
La concentració de dietilpirocarbonat necessària per inactivar l'enzim (pH 6.0, 60 min. 37°) és la mateixa en tots els casos (2-10 mM/mg de proteïna). Els substrats i productes retarden la velocitat d'inactivació (fig. 3.).

La modificació de residus d'histidina afecta de manera semblant els tres isoenzims de la PGM. Tal com s'ha descrit per l'isoenzim M de múscul de conill (Berrocal i Carreras, 1983a, 1983c) es perden les tres activitats si bé la sintasa i la fosfatasa són menys afectades. El 3-PG i el 2,3-BPG protegeixen del dietilpirocarbonat, però no de la foto-oxidació.

Modificació de cisteïnes.- Els tres isoenzims de la BPGS-BPGP s'inactiven pel tetratióat. Les diferències que es varen trobar en un principi (Tauler i Carreras, 1983), fóren degudes a una contaminació de

Fig. 4.- Efecte del fosfat inorgànic en la cinètica.

▲ Control (1,3-BPG 1 μM)
○ Pi (2 mM).



valors calculats, en una primera aproximació, de la K_m pel 1,3-BPG i el 3-PG són respectivament 0.8-1.5 μM i 1-2 μM .

Efectes inhibidors i activadors.- Rose (1980) ha demostrat una marcada inhibició competitiva del Pi respecte al 3-PG en la BPGS-BPGP d'eritròcits. Els isoenzims de la BPGS-BPGP de porc no són afectats pel Pi (fig. 4).

El glicolat-2-P estimula notablement les activitats bisfosfoglicerat fosfatasa i sintasa (Rose 1980) de la BPGS-BPGP d'eritròcits. Els isoenzims de la BPGS-BPGP de porc són molt menys afectats; el grau d'activació de l'activitat sintasa no supera el 200 %.

Diferents compostos fosforilats (F-2,6-P₂, G-1,6-P₂, F-1,6-P₂, α -glicerol-P, β -glicerol-P, ATP, ADP, citrat, P.E.P.) assajats com a possibles activadors o inhibidors, no afecten de manera significativa l'activitat sintasa dels isoenzims BPGS-BPGP de porc.

Discussió

Els resultats de la modificació de residus específics d'aminoàcids confirmen el caràcter multifuncional dels isoenzims de la PGM i de la BPGS-BPGP, suggerida per altres criteris. Demostra també la similitud entre ambdós grups d'enzims, confirmada pels experiments cinètics.

La similitud de les característiques estructurals i funcionals dels dos grups d'isoenzims de PGM i BPGS-BPGP podrien explicar-se admetent que ambdós grups resulten de la combinació dels dos tipus de subunitat de la PGM amb un altre tipus de subunitat diferent.

Agraïment.

Treball realitzat gràcies al suport de C.A.I.C.Y.T.

Bibliografia.

- BARTRONS, R., CARRERAS, J. (1982) Purification and characterization of phosphoglycerate mutase isozymes from pig heart. Biochem. Biophys. Acta. **708**, 167-177.
- BERROCAL, F., CARRERAS, J. (1983), Comparación estructural y funcional de las isozimas de la fosfoglicerato mutasa de mamífero. Biología del Desarrollo. Societat Catalana de Biologia, **1**, 19-23.
- BERROCAL, F. CARRERAS, J. (1983) Metabolism of glycerate-2,3-P₂ III. Arginine-specific reagents inactivate the phosphoglycerate mutase, glycerate-2,3-P₂ synthase and glycerate-2,3-P₂ phosphatase activities of rabbit muscle phosphoglycerate mutase. Comp. Biochem. Physiol. **1**, 9-14.
- BERROCAL, F. CARRERAS, J. (1983). Metabolism of glycerate-2,3-P₂ -V. Histidine-specific reagents inactivate the phosphoglycerate mutase, glycerate-2,3-P₂ synthase and glycerate-2,3-P₂ phosphatase activities of rabbit muscle phosphoglycerate mutase. Comp. Biochem. Physiol. **76B**, 795-799.
- BERROCAL, F. CARRERAS, J. (1984), Metabolism of glycerate-2,3-P₂ -VI. Lysyl-specific reagents inactivate the phosphoglycerate mutase, glycerate-2,3-P₂ synthase and glycerate-2,3-P₂ phosphatase activities of rabbit muscle phosphoglycerate mutase. Comp. Biochem. Physiol. **77B**, 475-481.
- 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. **70B**, 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 sulfhydryl group reagents. Comp. Biochem. Physiol. 71B, 57-63.
- CARRERAS, J., MEZQUITA, J. PONS, G. (1982). Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases-V. Inactivation of phosphoglycerate mutase isozymes by histidine-specific reagents. Comp. Biochem. Physiol. 72B, 401-407.
- CHIBA, H. SADAHI, R. (1978). Functions of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. Curr. Top. in Cell. Reg. 14, 75-116.
- GRISOLIA, S., MOORE, K., LUQUE, J. GRADY, H. (1969). Automatic procedura for the microestimation of 2,3-diphosphoglycerate. Anal. Biochem. 31, 235.
- TOWNE, J.C., RODWELL, V.W., GRISOLIA, S. (1957). The microestimation, distribution and biosynthesis of 2,3-diphosphoglyceric acid. J. Biol. Chem. 226, 777-788 .
- KRIMSKY, J. (1958) , Enzymatic formation of high levels of 1,3-diphosphoglycerate from 3-phosphoglycerate. Isolation and further metabolism . J. Biol. Chem. 234, 224-231.
- MEZQUITA, J. CARRERAS, J. (1981). Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases .-I Electrophoretic phenotypes of the glycerate-2,3-P₂ dependent phosphoglycerate mutase in vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 70B, 237-245.
- PONS, G. CARRERAS, J. (1983). Comparació funcional dels enzims amb activitat glicerat-2,3-P₂ fosfatasa del múscul esquelètic de mamífer. Biologia del Desenvolupament. Societat Catalana de Biologia. 1, 31-35.
- TAULER, A. CARRERAS, J. (1983). Comparació estructural dels isoenzims de la fosfoglicerat mutasa i de la glicerat-2,3-P₂ sintasa/fosfatasa de mamífer. Biologia del Desenvolupament . Societat Catalana de Biologia. 1, 25-29.
- ROSE, Z.B. (1980). The enzymology of 2,3-bisphosphoglycerate. Adv. Enzymol. 51, 211-253.