

ESTUDI ELECTROFORÈTIC DE LA 2,3-DIFOSFOGLICERAT-MUTASA ERITROCITÀRIA DE L'ADULT NORMAL

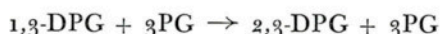
Comunicació presentada el dia 13 de desembre de 1973
pel doctor

JOAN-LLUÍS VIVES i CORRONS

(Treball dut a terme a l'Hospital Beaujon de París sota la direcció
del Professor PIERRE BOIVIN. «Centre de diagnòstic de les eritroenzimopaties»)

INTRODUCCIÓ

L'enzim 2,3-difosfoglicerat-mutasa (2,3-DPGM; E.C.: 2.7.5.4.) catalitza la següent reacció irreversible:



Hom troba aquest enzim quasi exclusivament a l'eritròcit i teixit muscular³ on constitueix la «clau» de la via de RAPOPORT-LUEBERING derivació important de la via metabòlica d'EMBDEN-MEYERHOFF o glicòlisi anaeròbia, principal font energètica de l'eritròcit (vegeu fig. 1). La importància d'aquesta derivació col·lateral ha estat posada en relleu per nombrosos autors^{2, 5, 7} i per nosaltres mateixos en una publicació recent⁸. Els efectes fisiològics del 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG), producte de l'acció de la 2,3-DPGM sobre el substrat 1,3-difosfoglicerat (1,3-DPG) són esquematitzats a la fig. 2.

Les propietats funcionals (cinètiques i termodinàmiques) de l'enzim 2,3-DPGM han estat l'objecte d'estudis recents portats a cap per ROSE^{4, 6}, i les seves propietats electroforètiques han estat estudiades per CHEN i col·laboradors¹.

El propòsit d'aquest treball és doble: 1) Posar a punt un mètode senzill i realitzable, a nivell de qualsevol laboratori mitjanament dotat, de l'electroforesi sobre gel de midó; 2) Posar en evidència, dins una població de 280 subjectes sans, la imatge fenotípica corrent o característica per a aquest enzim, i la possible troballa d'alguna nova variant fenotípica. Els

nostres resultats ens han permès de confirmar la importància de la tècnica emprada en la caracterització fenotípica d'un enzim mitjançant l'electro-

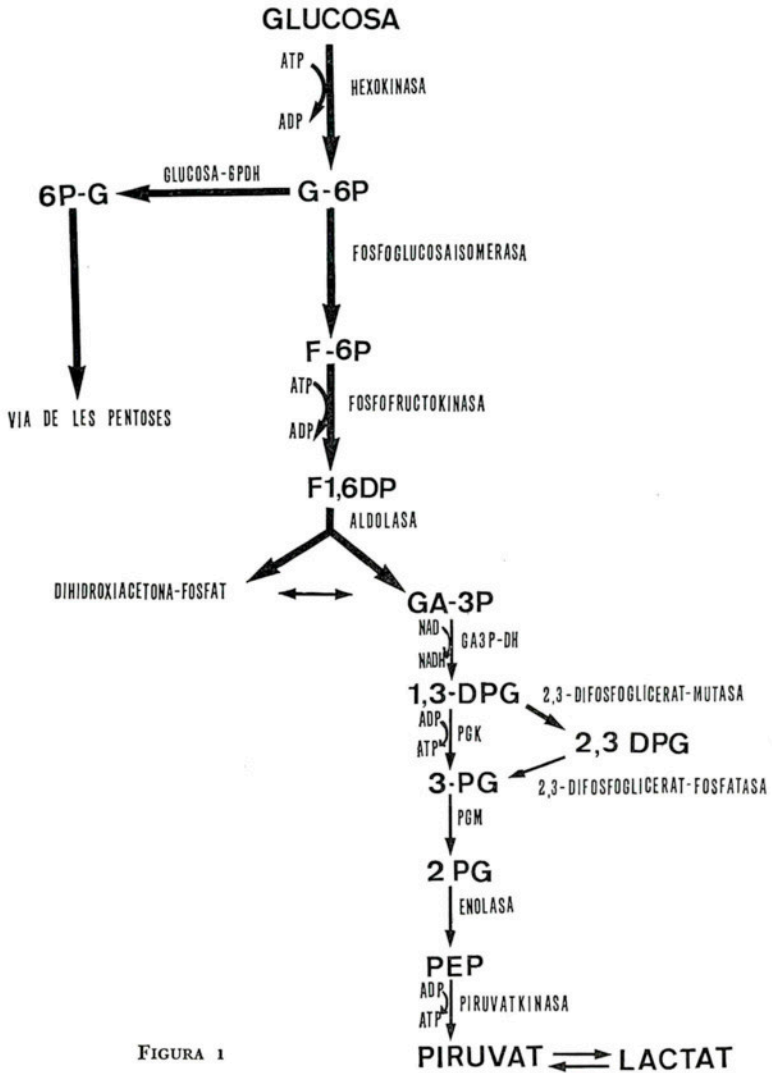


FIGURA 1

foresi, i l'existència per a aquest enzim d'una baixa incidència de polimorfisme genètic. Concloem amb una possible interpretació del mecanisme de síntesi genètica per a aquest enzim.

MATERIAL I MÈTODES

Per a dur a terme aquest estudi hem emprat el material següent:

1. Equip d'electroforesi per gel de midó (dues cubetes i una font d'alimentació energètica).

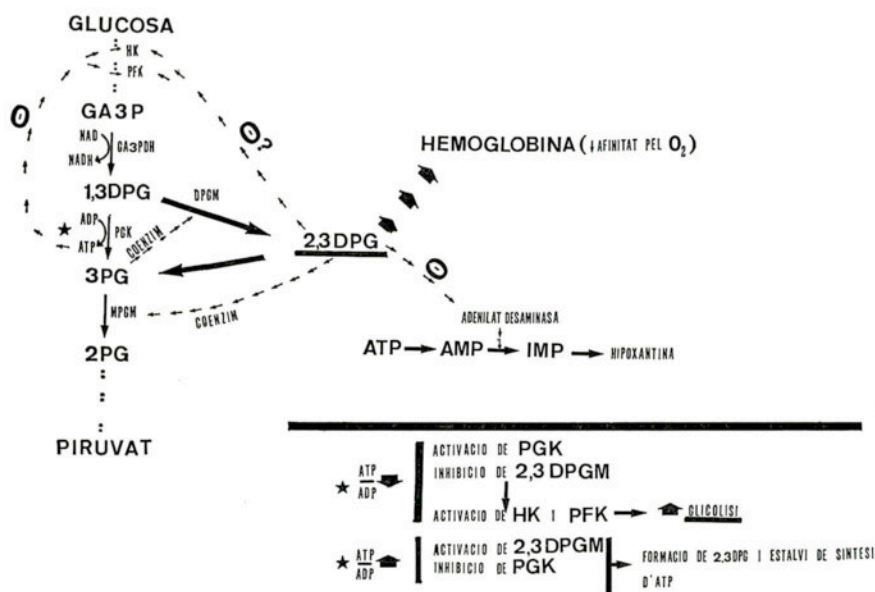


FIGURA 2

2. Midó en pols «Starch hydrolysed» de la marca «Connaught».
3. Diferents tampons per a cubetes i preparació del gel de midó:

tampó cubetes: Fosfat-Sòdic 0.15M. pH: 7.0

tampó de gel: Histidina-OHNa 0.05M. pH: 7.0

4. Substrats, enzims i coenzims per al revelat del gel i per a la mesura de l'activitat de 2,3DPGM dels hemolitzats emprats, tots fornits per la casa Boehringer-Mannheim.

5. Font de raigs ultraviolats per a la visualització de les fraccions després del revelat (longitud d'ona d'emissió dels raigs: 340 mil·limetres o nanòmetres).

El mètode utilitzat per nosaltres ha estat el descrit per CHEN i collab.¹ amb les modificacions següents:

Electroforesi sobre gel de midó de tipus horitzontal.
Modificació de la tècnica del revelat de l'enzim després de la migració.

La preparació de l'hemolitzat ha estat feta a partir d'1 ml de glòbuls vermells després d'haver-los rentat tres cops consecutius en una solució de NaCl 0,15M., i haver-hi afegit 1 ml d'aigua destil·lada i 0,5 ml de toluè. Per a la migració hem emprat 600 microlitres (0,06 ml) de l'hemolitzat preparat. Aquesta migració ha estat feta emprant gel de midó horitzontalment i aplicant un camp elèctric de 4,5 volts/cm durant un temps de 18 hores (tot a 4° C).

El dosatge de l'activitat 2,3-DPGM de l'hemolitzat ha estat fet d'acord amb el procediment de RAPOPORT ja descrit³: a una cubeta de 3 ml afegim:

Tampó fosfat-cisteïna 2,5. 10⁻²M. pH: 7.2
Fructosa 1,6-difosfat (F-1,6-DP) 0.15 M
NAD 6.10⁻³M.
3-fosfoglicerat (3-PG) 3.10⁻²M
Glicerinaldehid, 3-fosfat deshidrogenasa (GA₃PD) 5μl.
Aldolasa 5μl.
Hemolitzat a 1/20 en aigua destil·lada.

El revelat de la placa de midó després de la migració ha estat aconseguit incubant-hi a sobre, immediatament després de l'electroforesi, la següent solució en quantitat final de 30 ml.

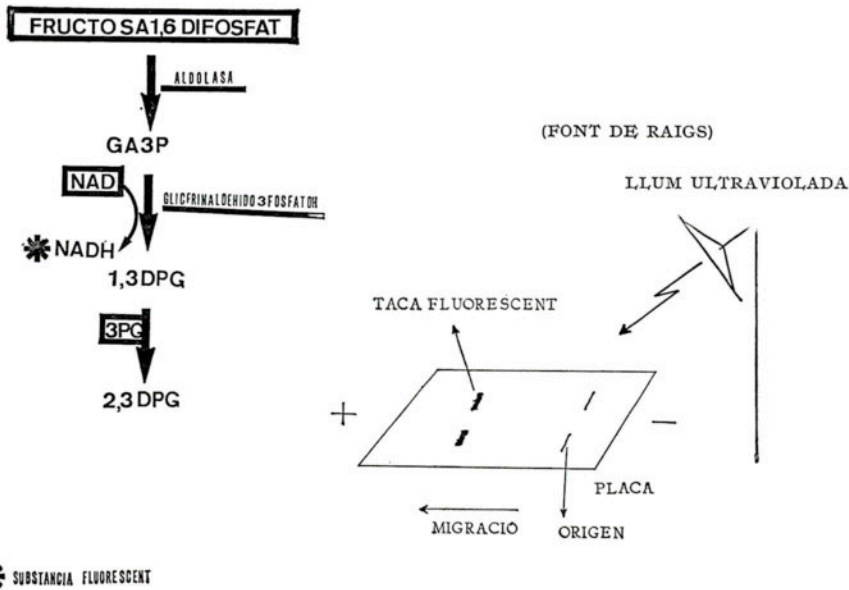
TRIS HCl 1M
Fructosa 1,6-difosfat 10⁻²M
3-fosfoglicerat 4.10⁻³M
NAD 1,5.10⁻³M
K₂HPO₄ 10⁻³M
Aldolasa
Glicerinaldehid, 3-fosfat deshidrogenasa (GA₃PD) 10μl.
Agar al 4 %

La incubació és feta a 37° C durant un temps mínim de 2 hores, després de les quals cal mirar la placa sota l'acció d'una font de raigs ultraviolats (de 340 mμ). D'aquesta manera, al lloc on hi hagi l'enzim 2,3-DPGM dintre el gel de midó apareixerà una taca fluorescent d'acord amb la for-

mació de NADH (substància que absorbeix selectivament a 340 m μ i emet fluorescència). El fonament d'aquesta tècnica de revelat és expressat a la fig. 3.

La determinació posterior de la quantitat de 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG), format damunt el gel després de la incubació, ha estat feta mitjançant el KID-2,3-DPG de la casa SIGMA.

REVELAT DE LA PLACA



* SUBSTANCIA FLUORESCENT

FIGURA 3

Finalment, la semipurificació de la 2,3 DPGM ha estat feta d'acord amb la tècnica de ROSE⁴ per tal d'estudiar el comportament electroforètic de l'enzim separat parcialment, en comparació amb el de l'hemolitzat fresc.

RESULTATS

En el conjunt dels 280 subjectes estudiats hem trobat per a la 2,3-DPGM una mateixa imatge fenotípica consistent en tres fraccions de migració catòdica, la més lenta de les quals es troba a una distància de l'ori-

gen que varia d'unes proves a unes altres entre 4 i 7 cm (fig. 4, C). La imatge es caracteritza per l'existència d'una fracció central més gruixuda i una fluorescència més intensa, que va precedida d'una fracció de migració més ràpida molt tènue, i seguida d'una altra de molt pròxima però d'una intensitat lumínica molt inferior. De fet la que destaca és la fracció mitjana.

La migració de l'extret enzimàtic semipurificat ens dona una imatge idèntica, però amb una separació i nitidesa més gran de les fraccions.

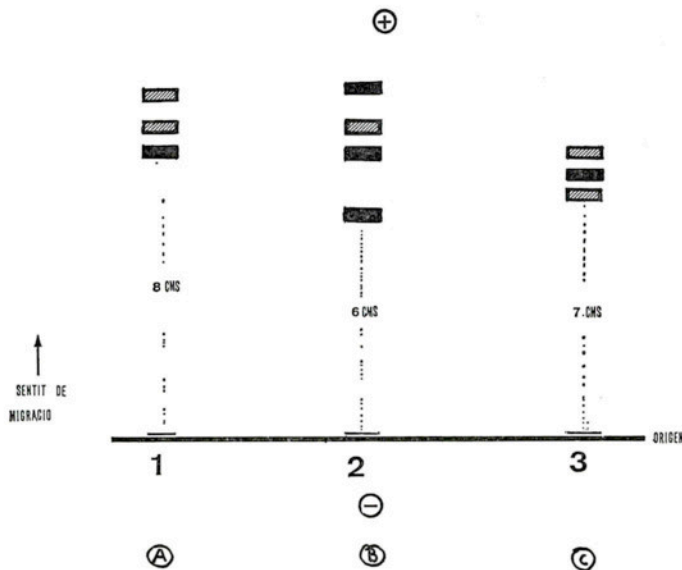


FIGURA 4

El fet que aquestes fraccions fluorescents a $340\text{ m}\mu$ que veiem constantment després de la incubació esmentada siguin degudes a la presència de la 2,3-DPGM i no pas a qualsevol altre artefacte o activitat enzimàtica es basa en les consideracions següents:

1. La presència d'aquestes fraccions indica la formació local d'un compost fluorescent a $340\text{ m}\mu$ que, tenint en compte els ingredients del revelat, no pot éser altre que el NADH, per tal com el NADH es produeix sota l'acció de l'enzim glicerinaldehid, 3-fosfat deshidrogenasa amb la síntesi final d'1,3-DPG. Cal, però, que, per a produir una quantitat suficient de NADH, hi hagi quelcom que permeti aquesta reacció eliminant l'1,3-DPG que es

va formant. L'enzim 3-fosfogliceratkinasa, que podria ésser responsable (vegeu fig. 3), és inhibit per l'excés de 3-PG, i no hi ha altre remei sinó pensar que la reacció és continuada per la 2,3-DPGM, que té com a substrat específic l'1,3-DPG.

2. Una prova del que ha estat exposat anteriorment és que, sense la fructosa 1-6-difosfat (F, 1,6-DP), les fraccions no apareixen, i ho fan en un grau molt baix si deixem de posar-hi el 3-PG.

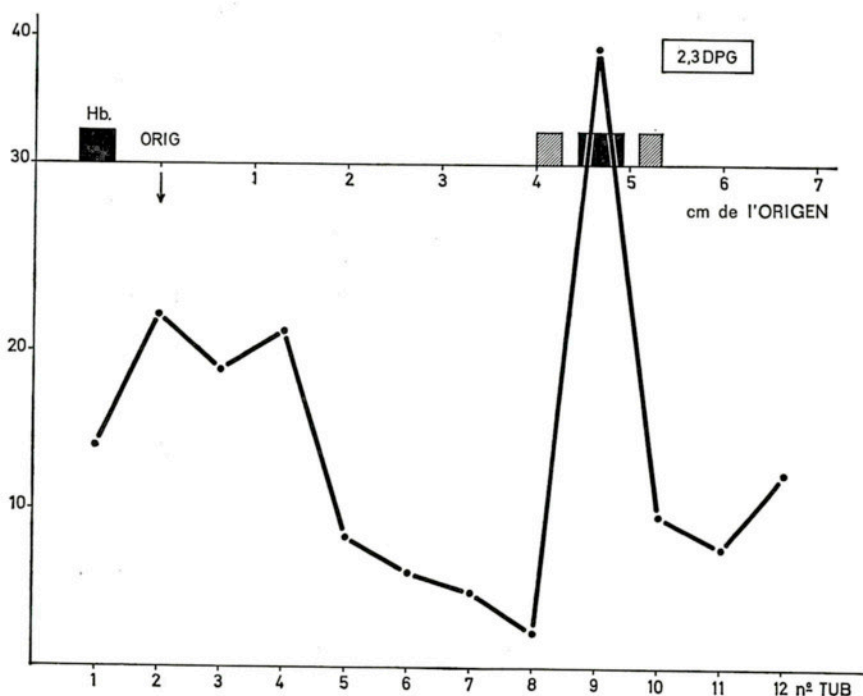


FIGURA 5

3. L'anàlisi del contingut en 2,3-DPG en diferents porcions del gel de midó ens proporciona un pic de gran intensitat en el lloc on es troben precisament les imatges fluorescentes, i no és possible d'aconseguir una separació perfecta de la quantitat de 2,3-DPG de cada una de les fraccions. Això indica una formació local de 2,3-DPG secundària al desenvolupament de la reacció catalitzada per la 2,3-DPGM (fig. 5).

DISCUSSIÓ I COMENTARIS

La imatge fenotípica obtinguda de l'enzim 2,3-DPGM, mitjançant la migració electroforètica sobre gel de midó, s'ha mantingut constant en el conjunt dels 280 subjectes normals estudiats. Això posa de manifest l'escàs polimorfisme d'aquest enzim, almenys a la població on ha estat estudiat. D'altra banda, l'existència d'algunes diferències entre la imatge obtinguda ací i la descrita per CHEN i col·lab. en un treball anterior¹ ens fa pensar en la importància de la tècnica emprada quan es tracta de definir la imatge electroforètica d'un enzim donat.

Si ens fixem en la figura 4, veurem una comparació entre la imatge fenotípica obtinguda per nosaltres (fig. 4, C) i la descrita per CHEN i col·lab. en llur treball¹ (fig. 4, A). Aquests autors obtingueren, sobre un total de 1.060 subjectes estudiats, una imatge fenotípica constant caracteritzada per tres fraccions de migració catòdica; però, contràriament als nostres resultats, la fracció de gruix i d'intensitat de fluorescència més grans és la més lenta, és a dir, la més anòdica, i és precedida per dues fraccions molt fines, la més ràpida de les quals és a vegades imperceptible (fig. 4, A).

Aquests autors aconseguixen, de més a més, d'identificar una única variant fenotípica de la imatge convencional en una família d'esquimals, la qual es caracteritza per diverses fraccions (fig. 4, B). Si considerem, doncs, que la freqüència de variants és per a aquest enzim inferior a 1/1.060, la probabilitat que haguéssim trobat una variant en un grup de només 280 subjectes era molt petita.

L'existència de polimorfisme dins els enzims en general i els de l'eritròcit en particular és un fet conegut^{2, 10}. Dins els enzims eritrocítics, alguns presenten un grau més fort de polimorfisme que d'altres. Com a exemple, de l'enzim glucosa-6-fosfats-deshidrogenasa (G-6-PD), en el qual existeix un grau fort de polimorfisme genètic, han estat descrites fins ara més de 80 variants diferents. Aquest fet, però, es presenta així perquè, essent aquest enzim el de més gran incidència en dèficit congènit, ha estat profusament estudiat des de molts aspectes diferents i no pas solament de l'electroforètic, de tal faísó que hi ha moltes variants de comportament electroforètic idèntic però de característiques funcionals diferents de la molècula enzimàtica.

Les conclusions que podem deduir de l'estudi present són:

- 1) Del punt de vista tècnic, el nostre procedir presenta sobre el mètode de CHEN i col·lab.¹ l'únic avantatge de la senzillesa i pot ésser dut a terme sense la necessitat de l'equip d'electroforesi vertical; calen només

un parell de cubetes i una font d'alimentació (objectes a l'abast de qual-sevol laboratori mitjanament dotat).

2) Pel que fa als resultats, si bé la nostra tècnica ens permet d'obtenir una imatge fenotípica un xic diferent de la publicada per CHEN i collab.¹, això només pot ésser atribuïble a la diferent tècnica emprada, que confir-

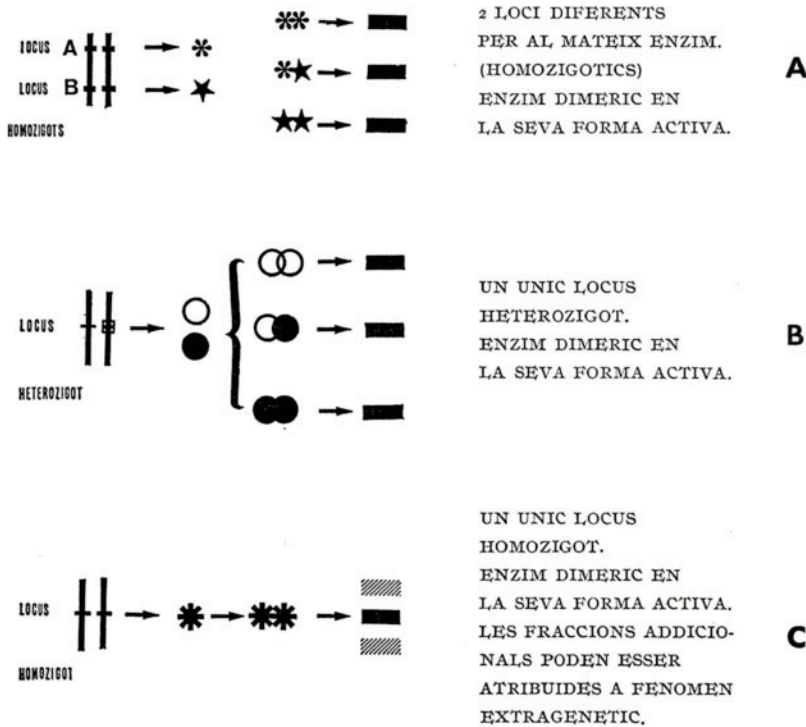


FIGURA 6

ma, d'altra banda, per a aquest enzim, l'existència d'un baix grau de polimorfisme genètic, i també el possible mecanisme genètic de síntesi ja exposat pels autors esmentats: l'enzim 2,3-DPGM estaria sintetitzat per un sol lloc autosòmic amb un nombre molt escàs d'allels, i la seva presentació més freqüent seria l'homozigòtica; tindria l'estructura d'un dímer en la seva forma activa (fig. 6, C) Les altres hipòtesis —a) l'existència de dos llocs diferents per al mateix enzim (fig. 6, A), o b) l'existència d'un únic lloc que presenta sempre una heterozigòtia (fig. 6, B)—, a la llum dels

resultats aportats tant per CHEN i col·lab.¹ com per nosaltres, han d'ésser descartades.

Així, segons la primera hipòtesi, a la imatge electroforètica, l'enzim seria representat per una fracció única: la de fluorescència més forta i de més gruix; mentre que les altres dues fraccions, més fines i poc visibles, podrien ésser molt bé atribuïdes a un fenomen epigenètic (modificació de l'estructura de l'enzim després de la síntesi) induït potser per la manipulació. A favor d'això hi hauria la diferència entre les imatges obtingudes per CHEN i col·lab.¹ i per nosaltres emprant tampons diferents, i també l'obtenció d'una fracció única per a aquest enzim quan la migració és duta a terme en un medi de poliacrilamida, després de sotmetre l'enzim a un procés de semipurificació¹.

Finalment, el fet d'haver estat descrita una variant fenotípica per a aquest enzim en una família d'esquimals¹, i veient que les seves característiques electroforètiques estan d'acord amb l'aparició d'un al·lel nou a nivell de l'únic lloc de síntesi de la 2,3-DPGM (heterozigòtia), confirma la hipòtesi de síntesi esmentada.

BIBLIOGRAFIA

1. CHEN, S. H., ANDERSON, J. E. i GILLET, E. R. — *2,3-Diphosphoglyceratemutase. Its demonstration by electrophoresis and detection of a genetic variant.* «Biochem. Gen.», 5, 481 (1971).
2. GIBLETT, E. R. — *Genetic Markers in human blood.* Blackwell Scient. Publ., 1969.
3. LEROUX, J. P. i NAJMAN, A. — *Biochimie et physiologie du 2,3-diphosphoglycerate erythrocytaire.* «Ann. Biol. Clin.», 29, 279 (1971).
4. RAPOPORT, S. i LUEBERING, J. — *The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: The existence of a diphosphoglycerate mutase.* «J. Biol. Chem.», 183, 3881 (1950).
5. ROSE, Z. B. — *The purification and properties of diphosphoglycerate mutase from human erythrocytes.* «J. Biol. Chem.», 243, 4810 (1968).
6. ROSE, Z. B. — *Enzymes controlling 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes.* «Fed. Proc.», 29, 1105 (1970).
7. ROSE, Z. B. i WHALEN, R. G. — *The phosphorylation of diphosphoglycerate mutase.* «J. Biol. Chem.», 218, 1513 (1973).
8. SAHROTER, W. i WINTER, P. — *Der 2,3-Diphosphoglyceratstoffwechsel in der Erythrocyten Neugeborener und Erwachsener.* «Klin. Wschr.», 45, 255 (1967).
9. VIVES, J. L. — *Importancia del ciclo de Rapoport-Luebering en el metabolismo intraeritrocitario.* «Med. Clín.», 62, 43 (1974).
10. VIVES, J. L., SANMIGUEL, J., BRUGES, R. M. i ROZMAN, C. — *El polimorfismo genético dentro de los enzimas intraeritrocitarios: Concepto e interés clínico.* «Sangre», 19, 133 (1974).