INACTIVACIÓ DE LA FOSFOGLICERATMUTASA PER FOTOOXIDACIÓ EN PRESÈNCIA DE ROSA DE BENGALA I DE BLAU DE METILÈ *

per

JOVITA MEZQUITA i JOSEP CARRERAS

Departament de Fisiologia i Bioquímica. Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

Les fosfogliceratmutases (PGA-mutases), enzims que catalitzen la interconversió reversible entre el 3-fosfoglicerat i el 2-fosfoglicerat, poden ésser de dos tipus, segons que necessitin o no el 2,3-difosfoglicerat (DPGA) com a cofactor. El mecanisme d'acció dels dos tipus de PGA-mutases és completament diferent. Les PGA-mutases independents del DPGA catalitzen una transferència intramolecular del grup fosforil entre dos hidroxils del substrat [1]. En canvi, les PGA-mutases dependents del DPGA catalitzen la transferència intermolecular del grup fosforil per un mecanisme de *ping-pong* que comporta la formació d'un fosfoenzim intermediari [2, 4].

Els dos tipus de PGA-mutases constitueixen un dels pocs exemples coneguts d'enzims anàlegs, o enzims que catalitzen una mateixa reacció sense estar relacionats entre ells des del punt de vista de la filogènia. Per aquest motiu, la investigació de llurs centres actius i de llurs mecanismes d'acció és important i pot aportar dades molt interessants sobre l'evolució dels enzims.

Experiments anteriors [3, 8, 9] han demostrat que la PGA-mutasa desnaturalitzada presenta un radical fosforil unit amb un residu d'histidina; si bé això no permet afirmar que passi el mateix amb l'enzim actiu. Per a investigar la participació de la histidina en el mecanisme d'acció de les PGA-mutases dependents del DPGA, hom pot recórrer a tècniques de bloqueig selectiu d'aminoàcids, per mitjà de l'etoxiformilació amb dietilpirocarbonat o bé per fotooxidació en presència de colorants.

* Treball fet amb l'ajut de la Borsa d'Estudis Leandre Cervera de l'Institut d'Estudis Catalans. Rebut, per a la seva publicació, el 28 de febrer de 1975.

El dietilpirocarbonat és un agent acilant que, en condicions experimentals avinents, mostra una afinitat molt específica envers la histidina. Experiments ja fets [5, 6] han demostrat que l'etoxiformilació de 4 residus d'histidina per mol de PGA-mutasa de múscul de conill, provoca una inactivació de l'enzim que resulta reversible per l'addició d'hidroxilamina.

La fotooxidació en presència de colorants és un mitjà suau i relativament específic per a modificar residus d'aminoàcids de molècules proteiques

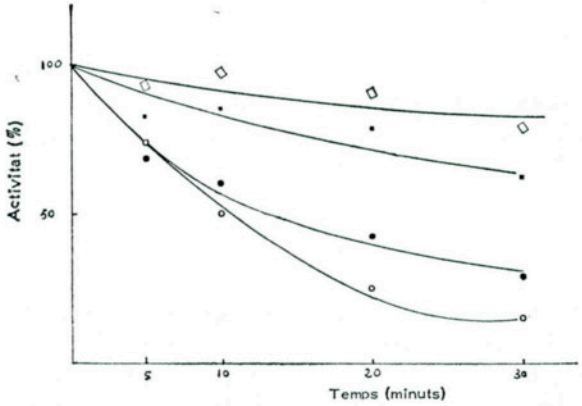

FIG. 1. — Fotooxidació de la PGA-mutasa de múscul de conill (0,5 mg/ml) en presència de blau de metilè.

(□, pM 5.6; ○ pM 7.8) y de rosa de Bengala. (■, pM 5.6; ● pM 7.8).

La fotooxidació de la PGA-mutasa de múscul de conill en presència de blau de metilè provoca una inactivació que és variable segons el pH, i sembla afectar la histidina [6, 7]. Essent també altres aminoàcids (triptòfan i metionina) susceptibles d'ésser fotooxidats en presència de blau de metilè, hom pot investigar la fotooxidació de la PGA-mutasa en presència de rosa de Bengala per tal d'assolir resultats més específics. Ha estat fet així, i ensems, hom ha investigat la cinètica de la inactivació, la possible acció protectora del cofactor (2,3-difosfoglicerat) i les característiques cinètiques de l'enzim parcialment inactivat.

MATERIAL I MÈTODES

Hem usat PGA-mutasa de múscul de conill de la casa Boehringer (suspensió cristal·lina amb sulfat amònic 2,6 M). L'enzim fou separat del sulfat

amònic per sedimentació i dissolució dels cristalls amb ClNa 10 mM (o bé amb l'amortidor adequat) i mitjançant una columna de Sephadex G-25. L'enolasa, el 3-fosfoglicerat i el 2,3-difosfoglicerat procedien de la casa

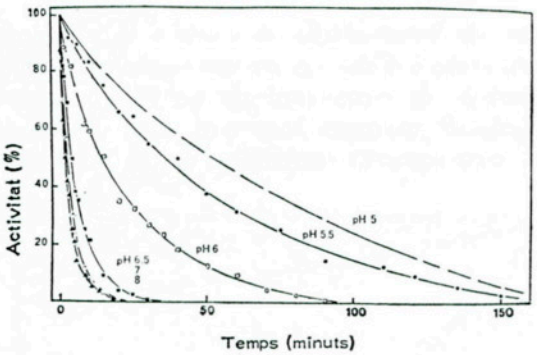

FIG. 2. — Fotooxidació de la PGA mutasa de múscul de conill (0,5 mg/ml) en presència de blau de metilè (0,5 mg %).

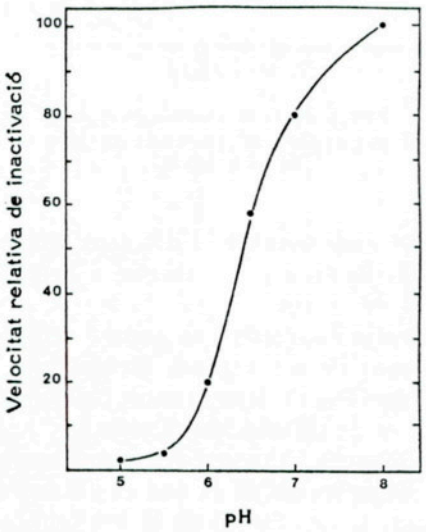

FIG. 3. — Velocitats relatives d'inactivació de la PGA-mutasa de múscul de conill en presència de blau de metilè, a diferents valors de pH.

Boehringer, el blau de metilè de Fuka, A. G., el rosa de Bengala de Sharlau i l'albúmina bovina (grau B) de Calbiochem. Els altres reactius eren productes purs per a anàlisi.

La concentració de proteïna era determinada per l'absorció a 280 nm (1,48 cm^2/mg de proteïna) i pel mètode de LOWRY i col. [10]. L'activitat de la PGA-mutasa, la vam determinar acoblant-hi l'enolasa i mesurant l'absorció (a 240 nm) deguda al fosfoenolpiruvat equilibrat amb el 2-fosfoglicerat [10].

Els experiments de fotooxidació eren fets a la cambra freda a fi de controlar la temperatura i d'obtenir un enfosquiment complet quan convenia. Les incubacions es realitzaven en un tub o receptacle adequat (EA-876-1 de l'equip de titulació Metrohm, mod. E422-0,5G) termoestabilitzat a 2 °C i amb agitació magnètica. Servia de font lluminosa un

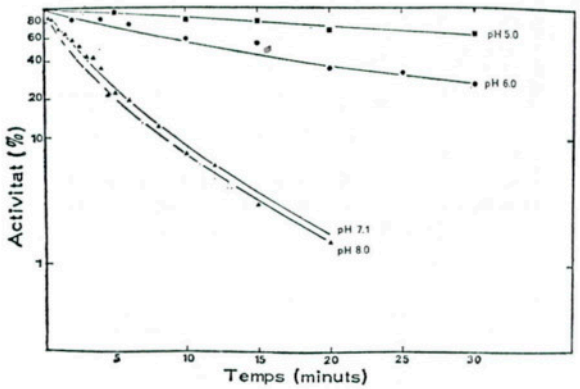

FIG. 4. — Fotooxidació de la PGA-mutasa de múscul de conill (0,5 mg/ml) en presència de blau de metilè (0,5 mg %).

projector Prado (Leitz) amb bombeta CZX (500 W) la llum de la qual era enfocada per l'objectiu (1 : 2,5, f = 10 cm) a l'eix del receptacle d'incubació, a la distància de 10 cm.

El volum de la barreja incubada fou gairebé sempre d'1 ml i la concentració de PGA-mutasa de 0,5 mg/ml. Després de 10 minuts, convenients per a assolir l'equilibri de temperatura i d'oxigenació, encara a les fosques, afegíem 10 μl de la dissolució del colorant, i al cap de 2 minuts es començava la il·luminació. Aquesta era interrompuda periòdicament per a agafar mostres alíquotes de 10 μl que es diluïen amb albúmina bovina al 1 % a fi d'evitar la inactivació de la PGA-mutasa. Aquestes dissolucions eren guardades a 2 °C i a les fosques fins al moment de mesurar l'activitat mutasa, cosa que fèiem a la penombra per evitar una oxidació ulterior. Servien de control mostres alíquotes de la barreja, agafades abans d'afegir el colorant i de començar la il·luminació.

La influència del pH sobre la inactivació per fotooxidació fou investigada amb amortidors de la mateixa forca iònica. Els experiments a pH entre 4 i 6 es feien amb l'amortidor acètic-acetat (0,25 M) i els experiments a pH superior a 7,0 amb l'amortidor tris-clorhídric (0,25 M). Per investigar el possible efecte protector del DPGA, aquest l'afegíem a la barreja incubada. Ensems fèiem sempre experiments de control en què la barreja, amb el colorant, es conservava sempre a les fosques.

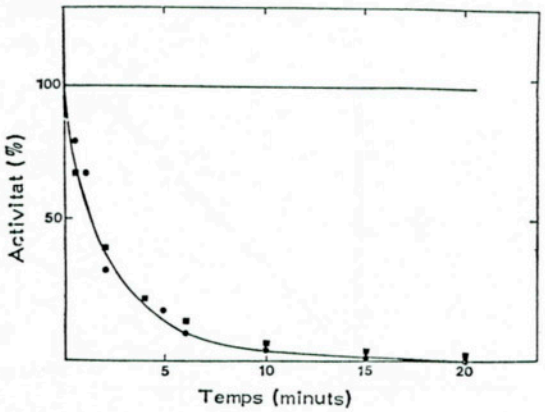

FIG. 5. — Foto-oxidació de la PGA-mutasa de múscul de conill (0,5 mg/ml) en presència de blau de metilè (0,5 mg %) amb cofactor (●) o sense cofactor (■). Control sense blau de metilè (○).

Per a investigar les característiques cinètiques de l'enzim fotooxidat, aquest el separàvem del colorant mitjançant cromatografia de gel-filtració amb Sephadex G-25, cosa que fèiem sempre a les fosques.

RESULTATS

La fotooxidació de la PGA-mutasa de múscul de conill, en presència de blau de metilè o de rosa de bengala, provoca una pèrdua de l'activitat enzimàtica que progressa amb el temps i pot arribar a l'anullació completa (fig. 1). Els experiments de control demostren que l'activitat no varia si la barreja es manté a les fosques o si hi falta el colorant.

La velocitat d'inactivació és variable segons el pH. La figura 2 mostra els resultats obtinguts en fotooxidar la PGA mutasa (0,5 mg/ml) en presència de blau de metilè (5 μl/ml) i amb valors de pH compresos entre 5 i 8 (força iònica 0,25 M). Les velocitats relatives d'inactivació (expressades pel temps necessari per a assolir una inactivació del 10 %) corresponents als diferents valors de pH són representades gràficament a la figura 3.

S'obté una corba sigmoide amb un punt d'inflexió que correspon a un pH pròxim a 6,5.

Experiments de fotooxidació semblants, però fets amb rosa de Bengala en lloc de blau de metilè, han donat els mateixos resultats qualitatius, si bé les inactivacions obtingudes en iguals condicions de concentració del colorant, de temperatura, de força iònica i de pH resulten amb rosa de Bengala més ràpides que amb blau de metilè.

La velocitat d'inactivació de la PGA-mutasa varia també segons la força iònica del medi. A pH 6,0 un augment de la força iònica del 2,5 % (de 0,1 M a 0,25 M) fa que la velocitat d'inactivació en presència de blau de metilè es redueixi en un 40 %.

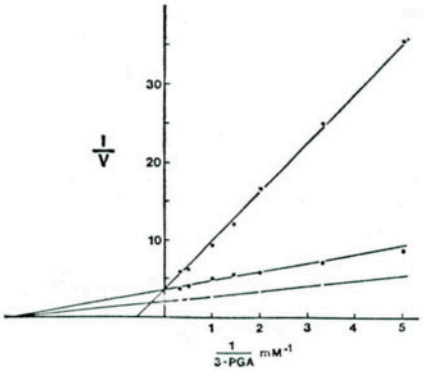

FIG. 6. — Cinètica de la PGA-mutasa de múscul de conill fotooxidada en presència de blau de metilè.

○ Control

■ enzim parcialment inactivat, amb ClK

● sense ClK

La inactivació de la PGA-mutasa en presència de blau de metilè o de rosa de Bengala segueix una cinètica de primer ordre només en el període inicial. La figura 4 demostra que la representació semilogarítmica del tant per cent d'activitat residual en funció del temps de reacció, solament és lineal durant la fase inicial.

La presència del cofactor 2,3-difosfoglicerat (20mM) no protegeix l'enzim de la inactivació provocada en presència de blau de metilè i a pH 7,0 (figura 5).

L'experiment representat en la figura 6 demostra que la fotooxidació de la PGA-mutasa afecta la velocitat màxima, però no modifica el valor de Km corresponent al 3-fosfoglicerat. D'altra banda, l'enzim parcialment inactivat és inhibit per la força iònica del medi, de manera semblant a com ho és l'enzim original. En presència de ClK 0,4 M augmenta el valor de Km corresponent al 3-fosfoglicerat sense que se n'alteri la velocitat màxima (figura 6).

El pH òptim de l'enzim parcialment inactivat per fotooxidació coin-

cideix amb el pH òptim de l'enzim original. El grau d'inactivació es manté constant entre valors de pH compresos entre 5 i 9 (figura 7).

Discussió

La inactivació de la PGA-mutasa per fotooxidació indica que l'activitat enzimàtica va lligada a algun dels aminoàcids susceptibles de fotooxidació (histidina, metionina, triptòfan, tirosina, cisteïna i cistina). La in-

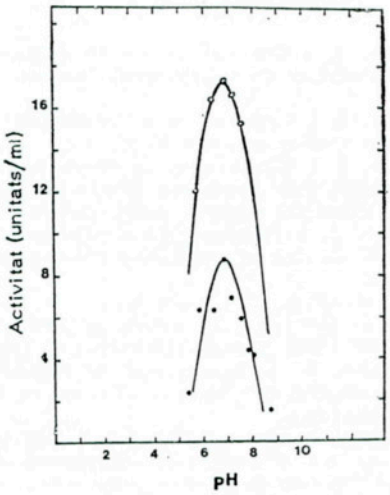

Fig. 7. — pH òptim de la PGA-mutasa original (○) i de la PGA-mutasa parcialment inactivada (●).

fluència del pH i de la força iònica sobre la velocitat d'inactivació permet suposar que la pèrdua d'activitat és deguda, en tot o en part, a la fotooxidació de residus d'histidina. La relació de tipus sigmoide entre la velocitat d'inactivació i els valors de pH del medi correspon a la fotooxidació de la histidina, especialment quan l'agent fotooxidant és el rosa de Bengala.

L'absència de cinètica de primer ordre en el procés d'inactivació podria ésser explicada per la presència en la molècula enzimàtica d'un cert nombre de residus d'histidina amb diferent fotosensibilitat o per l'existència d'isoenzims. També es podria explicar admetent que, a més de la histidina, resulten fotooxidats altres aminoàcids constituents del grup actiu o necessaris per a mantenir la conformació de l'enzim catalíticament actiu.

La disminució de l'activitat enzimàtica provocada per fotooxidació pot ésser deguda a una disminució de l'afinitat de l'enzim envers el substrat

(augment del valor de Km) o a la inactivació completa de les molècules d'enzim que resultin afectades. Els resultats dels experiments cinètics efectuats indiquen que la fotooxidació modifica solament la velocitat màxima, però no el valor de Km. Això demostra que els aminoàcids destruïts són imprescindibles per a l'acció enzimàtica, i que la possibilitat d'una disminució de l'afinitat de l'enzim envers el substrat pot ésser descartada.

BIBLIOGRAFIA

1. BRITTON, H. G., CARRERAS, J. i GRISOLIA, S. — *Mechanism of Action of 2,3-Diphosphoglycerate independent Phosphoglycerate Mutase.* «Biochemistry», *10:* 4522 (1971).
2. BRITTON, H. G., CARRERAS, J. i GRISOLIA, S. — *Mechanism of Yeast Phosphoglycerate Mutase.* «Biochemistry», *11:* 3008 (1972).
3. BRITTON, H. G., CARRERAS, J. i GRISOLIA, S. — *Formation of an Active Phosphoenzyme by Diphosphoglycerate Dependent Phosphoglyceromutases from Muscle, Kidney and Yeast.* «Biochim. Biophys. Acta», *289:* 311 (1972).
4. BRITTON, H. G., CARRERAS, J. i GRISOLIA, S. — *Applicatios on the induced-Transport Test to the Mechanism of Pig-Kidney Phospoglyceromutase.* «Eur. J. Biochem.», *36:* 495 (1973).
5. CARRERAS, J., BOSCH, J., MEZQUITA, J. i VIDAL SIVILLA, S. — *Essential Histidine and Cysteine Residues in the Catalytic Activity of DPGA — Dependent Phosphoglycerate Mutase.* «9th FEBS Meeting Abstracts», 94 (1974).
6. CARRERAS, J., i VIDAL-SIVILLA, S. — *Involvement of Histidine Residues in the Mechanism of the Phosphoglycerate Mutase.* «Resúmenes de las XI Jornadas Bioquímicas Latinas»: 162 (1973).
7. CARRERAS, J. i VIDAL SIVILLA, S. — *Inactivación de la fosfoglicerato mutasa dependiente del difosfoglicerato por foto-oxidación.* Resúmenes de la XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, 28 (1973).
8. GRISOLIA, S. i CARRERAS, J. — *Phosphoglycerate Mutase from Yeast, Chicken Breast Muscle, and Kidney (2,3 PGA-Dependent).* «Methods in Enzymology» XLII (66): 435 (1975).
9. ROSE, Z. B. — *Evidence of a Phosphohistidine Protein Intermediate in the Phosphoglycerate Mutase Reaction.* «Arch. Biochem. Biophys.» *140:* 508 (1970).
10. ROSE, Z. B. — *The phosphorylation of Yeast Phosphoglycerate Mutase.* «Arch. Biochem. Biophys.» *146:* 359 (1971).