

Influencia de reactivos de grupos -SH sobre la mevalonato cinasa parcialmente purificada de hígado de pollo

J. García-Martínez, A. Linares, M. D. Suárez y E. García-Peregrín

Departamento de Bioquímica
Universidad de Granada
Granada

(Recibido el 28 de diciembre de 1981)

J. GARCIA-MARTINEZ, A. LINARES, M. D. SUAREZ and E. GARCIA-PEREGRIN. *Influence of -SH Group Reagents on Partially Purified Mevalonate Kinase from Chick Liver*. Rev. esp. Fisiol., 38, 393-396. 1982.

Unlike other vertebrate mevalonate kinase, the enzyme partially purified from neonatal chick liver was not activated by the -SH group protectors reduced glutathione, cysteine, dithiothreitol and β -mercaptoethanol at any concentrations assayed (0.01-10.00 mM). However, the activity was found to be sensitive to thiol group binding reagents. p-Hydroxymercuribenzoate was the most active inhibitor. At 0.1 mM concentration, p-HMB completely abolished the enzyme activity. N-ethylmaleimide (0.01-1.00 mM) was practically ineffective. Inhibition by p-HMB was temperature dependent, being more potent at 37° C than at 4° C.

La mevalonato cinasa (EC 2.7.1.36) cataliza la transformación del ácido mevalónico (MVA) en ácido 5-fosfomevalónico (MVAP) como primer paso de una ruta metabólica de gran interés que conduce a la biosíntesis del colesterol, vía isopentenilpirofosfato y escualeno. Aunque la enzima ha sido purificada y caracterizada en mamíferos, es muy poco lo que se conoce sobre sus particularidades en aves. Su importancia en la colesterogénesis hepática fue puesta de manifiesto por DORSEY y PORTER (3) al demostrar su inhibición por geranilpirofosfato y farnesilpirofosfato. Estos y otros prenilpirofosfatos actúan también como inhibidores incompetitivos de la enzima de plantas superiores y levadura (10).

A lo largo del desarrollo postnatal, la mevalonato cinasa presenta ciertas variaciones en su actividad. Así, en hígado de pollo se ha demostrado un incremento claro a partir de la primera semana después de la eclosión, una vez producida la regresión del saco vitelino (5), mientras que en cerebro y en riñón las variaciones son menos acusadas (13). También en larvas de *Sarcophaga bullata* se habían observado cambios en la actividad mevalonato cinasa durante el desarrollo (1). Sin embargo, la formación de MVAP resultó semejante en hígado de ratas lactantes y destetadas (18), mientras que la formación de isopentenilpirofosfato fue muy superior en estas últimas.

En trabajos anteriores hemos estudiado

las propiedades de las enzimas fosforilantes del MVA en homogenados de hígado (6), riñón (12) y cerebro (14) de pollo recién nacido, poniendo de manifiesto algunas de sus particularidades distintas, lo cual nos ha llevado a purificar, al menos parcialmente, la mevalonato cinasa hepática y a establecer las oportunas comparaciones entre la enzima purificada y no purificada. En este sentido, en el presente trabajo se estudia el comportamiento de la mevalonato cinasa parcialmente purificada frente a diversos reactivos de grupos -SH, aspecto en el que la enzima de pollo difiere considerablemente de la aislada a partir de otros orígenes animales y vegetales.

Material y métodos

Se han utilizado pollos recién nacidos de raza Leghorn Blanca, alimentados con dieta estándar. El [2-¹⁴C] MVA fue suministrado al estado de lactona por «The Radiochemical Centre», Amersham. El MVA no marcado procedía de Sigma y se mezcló con el radiactivo hasta obtener la actividad específica requerida. Los otros reactivos eran de grado «para análisis» de diversas firmas comerciales. La purificación parcial de la enzima y las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo según se ha descrito anteriormente (4, 12). Las proteínas se han determinado por el método de LOWRY *et al.* (15). El producto de la reacción, MVAP, se identificó según lo descrito por GARCÍA-PEREGRÍN *et al.* (8).

Resultados

Con objeto de estudiar si la mevalonato cinasa parcialmente purificada de hígado de pollo requería la presencia de agentes protectores de grupos -SH para el mantenimiento de su actividad, se determinó el efecto de la suplementación de glutatión reducido, cisteína, ditiotrei-

Tabla I. Efecto de algunos protectores de grupos -SH sobre la actividad mevalonato cinasa parcialmente purificada de hígado de pollo.

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la mezcla estándar de reactivos y con la suplementación del protector a la concentración indicada.

Concentración (mM)	MVAP formado (dpm x 10 ⁻³ /mg proteína/30 min)			
	Glutatión reducido	Cisteína	Ditiotreitól	β -mercaptoetanol
0,00	108,81	108,81	108,81	108,81
0,01	96,72	102,77	96,72	90,68
0,10	84,63	96,72	96,72	84,63
1,00	84,63	96,72	102,77	84,63
10,00	76,49	78,59	96,72	78,59

tal y β -mercaptoetanol a concentraciones 0,01-10 mM. La formación de MVAP no se incrementó por la adición de estos reactivos, observándose incluso una ligera disminución en presencia de alguno de ellos (tabla I).

El efecto de algunos agentes bloqueantes de grupos -SH, tales como el p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y N-etilmaleimida, sobre la mevalonato cinasa parcialmente purificada puede verse en la tabla II. El p-HMB inhibió completamente a la enzima a partir de una concentración 0,1 mM. El DTNB apenas tuvo efecto a la misma concentración, mientras que a 1 mM produjo una fuerte inhibición y a 10 mM inhibía completamente a la enzima. La N-etilmaleimida 10 mM sólo producía una inhibición del 60 %, aproximadamente.

Con el fin de comprobar el efecto de la temperatura sobre la inhibición por agentes que bloquean los grupos -SH, se hicieron una serie de reacciones en las que la enzima purificada se mantuvo a 4° C y a 37° C durante 0-60 min en presencia de p-HMB 0,005 mM, concentración a la cual debía ejercer una cierta inhibición según los resultados previamente obtenidos. Una vez finalizada la

preincubación a cualquiera de las temperaturas y tiempos mencionados, se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas según el procedimiento usual. Los resultados obtenidos (fig. 1), ponen de manifiesto que la inactivación de la mevalona-

to cinasa por p-HMB es mucho más lenta a 4° C que a 37° C. A esta última temperatura bastan 5 min de preincubación con el inhibidor para que la enzima se inactive completamente, mientras que la preincubación a 4° C durante el mismo tiempo prácticamente no tiene efecto alguno. Cuando la preincubación se prolonga durante 60 min la inactivación es total, incluso a 4° C.

Tabla II. *Influencia de algunos agentes que bloquean los grupos -SH sobre la mevalonato cinasa parcialmente purificada de hígado de pollo.*

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la mezcla estándar de reactivos y la suplementación del agente a la concentración indicada. p-HMB: p-hidroximercuribenzoato. DTNB: 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico).

Concentración (mM)	MVAP formado (dpm $\times 10^{-3}$ /mg proteína/30 min)		
	p-HMB	DTNB	N-etilmaleimida
0,00	108,81	108,81	108,81
0,01	30,23	84,63	102,77
0,10	0,00	84,63	108,81
1,00	0,00	47,54	96,72
10,00	0,00	0,00	48,36

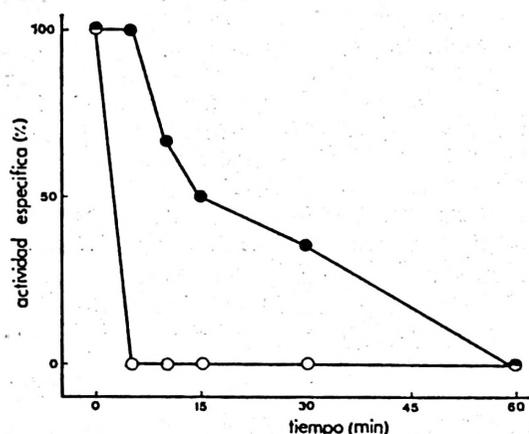


Fig. 1. *Efecto de la temperatura sobre la inhibición de la mevalonato cinasa por p-HMB.* La enzima parcialmente purificada de hígado de pollo se preincubó a 4° C (●) o a 37° C (○) durante el tiempo indicado en presencia de p-HMB 0,005 mM. Posteriormente, las reacciones se llevaron a cabo según el procedimiento usual.

Discusión

El hecho de que no se requieran protectores de grupos -SH para la formación de MVAP por la mevalonato cinasa parcialmente purificada es una característica distintiva de la enzima de pollo ya que, con la excepción de la de *Sarcophaga bullata* (9), levadura (19) y *Hevea brasiliensis* (20), todos los autores que se han ocupado de este tema empleando los más diversos orígenes coinciden en el efecto favorecedor de tales protectores y, en la mayoría de los casos, se señala su presencia como imprescindible. Así, la enzima purificada de hígado de cerdo (11) y de conejo (16) requiere cisteína o β -mercaptoetanol, perdiendo un 70-80 % de su actividad cuando se conserva a 4° C durante 10 días en ausencia de protectores (2). En vegetales, son conocidos los requerimientos específicos frente a tales protectores por preparaciones enzimáticas de varios orígenes (7, 8, 17). Sin embargo, la mevalonato cinasa de hígado de pollo, tanto en preparaciones dializadas como no dializadas (6), no incrementa su actividad por la suplementación de glutatión, cisteína, ditiotretol o β -mercaptoetanol, reactivos que tampoco afectan a la enzima parcialmente purificada ni a la de cerebro (14) o riñón (12) del mismo origen, o incluso parecen disminuir ligeramente su actividad.

Por otra parte, la mevalonato cinasa parcialmente purificada de hígado de pollo es altamente sensible a alguno de los

reactivos que bloquean los grupos -SH, especialmente frente al p-HMB, como se había observado en preparaciones crudas de hígado (6), riñón (12) y cerebro (14). El mismo agente se había descrito como inhibidor potente de la enzima de hígado de otros animales (2, 9, 11, 16), mientras que la N-etilmaleimida, también descrita como inhibidor (7, 9, 20), no afecta, o lo hace muy ligeramente, a la enzima de hígado de pollo. La inhibición es más fuerte cuando se trabaja con preparaciones enzimáticas purificadas, ya que el p-HMB 0,01 mM no afecta a la enzima no purificada (6) y sí a la enzima purificada. En cualquier caso, a pesar de la particularidad de no requerir protectores de grupos -SH, al menos alguno de estos grupos debe estar implicado en la mevalonato cinasa de hígado de pollo, grupo que es especialmente sensible al p-HMB y no es afectado por otros agentes de este tipo como la N-etilmaleimida.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (4089-79). Los autores agradecen a Avigrana S.A. el suministro de los pollos recién nacidos y a D.^a Dolores Franco su asistencia técnica.

Resumen

Al contrario de otras mevalonato cinasas de vertebrados, la enzima parcialmente purificada de hígado de pollo recién nacido no es activada por protectores de grupos -SH, tales como glutatión reducido, cisteína, ditioneitol y β -mercaptoetanol a concentraciones 0,01-10,00 mM. Sin embargo, la actividad es sensible frente a reactivos que bloquean los grupos -SH. El p-hidroximercuribenzoato es el inhibidor más fuerte. A concentración 0,1 mM, el p-HMB inhibe completamente a la mevalonato cinasa. La N-etilmaleimida (0,01-1,00 mM) prácticamente es inefectiva. La inhibición por p-HMB es dependiente de la temperatura, siendo más potente a 37° C que a 4° C.

Bibliografía

1. BARNES, F. J. y GOODFELOW, R. D.: *J. Insect Physiol.*, 17, 1625-1635, 1971.
2. BEYTA, E., DORSEY, J. K., MARR, J., CLELAND, W. W. y PORTER, J. W.: *J. Biol. Chem.*, 245, 5450-5458, 1970.
3. DORSEY, J. K. y PORTER, J. W.: *J. Biol. Chem.*, 243, 4667-4670, 1968.
4. GARCÍA-MARTÍNEZ, J., LINARES, A., SUÁREZ, M. D. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, 261-266, 1982.
5. GARCÍA-MARTÍNEZ, J., SEGOVIA, J. L., SUÁREZ, M. D. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 202-208, 1976.
6. GARCÍA-MARTÍNEZ, J., SEGOVIA, J. L., SUÁREZ, M. D. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 61B, 275-279, 1978.
7. GARCÍA-PEREGRÍN, E., y MAYOR, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 26, 209-216, 1970.
8. GARCÍA-PEREGRÍN, E., SUÁREZ, M. D., ARAGÓN, M. C. y MAYOR, F.: *Phytochemistry*, 11, 2495-2498, 1972.
9. GOODFELOW, R. D. y BARNES, F. J.: *Insect Biochem.*, 1, 271-282, 1971.
10. GRAY, J. C. y KEKWICK, R. G. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, 279, 290-296, 1972.
11. LEVY, H. R. y POPIAK, G.: *Biochem. J.*, 75, 417-428, 1960.
12. LINARES, A., AGUILERA, J. A., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B, 63-68, 1980.
13. LINARES, A., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., SUÁREZ, M. D. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Biol. Neonate*, 38, 25-29, 1980.
14. LINARES, A., MARCO, C., SUÁREZ, M. D. y GARCÍA-PEREGRÍN, E.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 115-120, 1981.
15. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
16. MARKLEY, K. y SMALLMAN, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 327-335, 1961.
17. POTTY, V. H. y BRUEMMER, J. H.: *Phytochemistry*, 9, 99-105, 1970.
18. RAMACHANDRAN, C. K. y SHAH, S. N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 42-47, 1976.
19. TCHEN, T. T.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1100-1103, 1958.
20. WILLIAMSON, I. P. y KEKWICK, R. G. O.: *Biochem. J.*, 96, 862-871, 1965.