

Piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.). Purificación y propiedades generales*

M.º J. Herranz-Santos y M. Ruiz-Amil

Departamento de Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense
28040-Madrid

(Recibido el 29 de marzo de 1984)

M.º J. HERRANZ-SANTOS and M. RUIZ-AMIL. *Pyruvate Kinase of Mussel Foot. Purification and General Properties*. Rev. esp. Fisiol., 41, 55-60. 1985.

The specific activity of pyruvate kinase in mussel foot is markedly higher than that from mantle and digestive gland. The foot enzyme shows maximum pH activity in the range between 7.0 and 7.5 and is stable (15 min, 37 °C) at pH values between 7.0 and 9.0. The activation energy value is 23 kJ/mol with a Q_{10} coefficient of 1.4. All of these experiments were carried out using partially purified extracts with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ treatment (30-60 %) and posterior dialysis with EDTA 1.2 mM. No isoenzymatic forms could be detected using the column chromatography techniques with Sephadex G-150, DEAE Sephadex A-50 and polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: Mussel foot, Pyruvate kinase.

La piruvatoquinasa (PK) (EC 2.7.1.40: ATP:piruvato fosfotransferasa) cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, con la simultánea formación de ATP. Es una enzima clave de la glicólisis y su importante papel regulador se pone de manifiesto por la gran cantidad de moduladores que influyen sobre su actividad, tales como hexosas fosforiladas, nucleótidos de adenina y aminoácidos (3, 9, 17), así como por la existencia de formas isoenzimáticas en los diferentes organismos y tejidos que muestran

diferente comportamiento cinético y/o electroforético (7, 12). Con respecto a esta enzima es también conocida la gran variabilidad de su actividad, comportamiento y propiedades, no sólo en diferentes organismos y sus diferentes partes, sino también en diferentes clases de músculos con funciones fisiológicas distintas. En consecuencia, los estudios comparativos de la enzima en distintos tejidos de la misma especie contribuye, en gran manera, al conocimiento de la función de la PK en la célula.

La PK ha sido estudiada en algunos tejidos del mejillón (*Mytilus edulis* L.) tales como manto (10) y músculo aductor (5, 6, 15, 16). En el presente trabajo se han determinado los niveles de actividad enzimática en diversos órganos del

* Este trabajo ha sido realizado con ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y en parte con aparatos donados por la Fundación Alexander von Humboldt.

mejillón (*Mytilus edulis* L.) y se ha estudiado el comportamiento de la enzima del pie de este animal, frente al pH y a la temperatura, así como su comportamiento cromatográfico y electroforético.

Material y métodos

Se utilizaron mejillones procedentes de la depuradora n.º 1 de Aguiño, recolectados en las Rías Bajas (Pontevedra). Todos los reactivos y productos químicos eran de grado analítico. Adenosín difosfato (ADP), fosfoenolpiruvato (PEP), nicotinamido adenindinucleótido reducido (NADH) y lactato deshidrogenasa (LDH) fueron suministrados por Boehringer.

Preparación de extractos enzimáticos. El pie, manto y hepatopáncreas de mejillón, se trocearon antes de su homogeneización. El pie, tejido más duro, se trituró previamente en homogeneizador de cuchillas. Para la homogeneización de los órganos se utilizó un volumen de TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, que es siempre cuatro veces el peso de tejido fresco. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron durante 30 min a 16 000 g, utilizándose los sobrenadantes para la determinación de la actividad enzimática en los distintos órganos. Para la determinación de las propiedades enzimáticas, objeto del presente trabajo, se empleó un preparado enzimático correspondiente al pie procedente del tratamiento del extracto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-60 % de saturación) obteniéndose un precipitado que fue redissuelto en el medio de homogeneización y se dializó durante la noche frente a EDTA 1,2 mM.

Ensayo de la actividad enzimática. La actividad de la piruvatoquinasa se ensayó de acuerdo con el método de BÜCHER y FELEIDERER (2) en un sistema acoplado con LDH y midiendo la variación de Absorbancia debida a la oxidación de NADH a 340 nm.

La mezcla de reacción contenía (mM): TRIS-HCl, pH 7,5, 50; KCl, 75; MgCl_2 , 8; PEP 1,5; ADP 2; NADH 0,18; 36 U.I. de LDH y 0,05 ml de fracción enzimática, conteniendo aproximadamente 0,2 mg de proteína. El volumen final fue de 3 ml.

Las proteínas se determinaron mediante el método de LOWRY *et al.* (11).

Para el estudio del comportamiento de la enzima frente al pH se utilizó la mezcla de reacción indicada y el pH se varió mediante el uso de disoluciones tampón de distinta naturaleza: tampón acetato para el pH entre 4-5,5; tampón TRIS-maleato para el pH entre 5,5-7,5; tampón TRIS-HCl para pH entre 7,5-9 y tampón glicina para pH entre 9-12,5.

La estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH se determinó en muestras mantenidas durante 15 min a 37 °C usando las disoluciones tampón ya indicadas. Para la determinación de la estabilidad de la enzima, respecto a la temperatura, en tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM, las muestras se mantuvieron a diferentes temperaturas durante 5 min. En ambos casos se tomaron alícuotas en las que se determina la actividad residual en las condiciones de ensayo señaladas. Las actividades así obtenidas, para las diferentes muestras, se refieren a la actividad de una muestra medida inmediatamente después de la preparación del extracto enzimático (sin tratamiento previo), considerando ésta como el 100 % de actividad.

La cromatografía se realizó utilizando dos tipos de fase estacionaria: Sephadex G-150 y DEAE-Sephadex A-50. Para la primera se utilizó la fracción enzimática parcialmente purificada procedente de la diálisis de la disolución del precipitado procedente de la fracción 30-60 % de saturación con sulfato amónico (0,3 mg proteína/ml de lecho de gel). La elución se realizó con tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM (300 ml). Las fracciones con actividad, eluidas en la

anterior cromatografía, se aplican directamente a la columna de DEAE-Sephadex A-50 y se pasan 300 ml de la misma disolución tampón, aplicando después un gradiente lineal formado por TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y mercaptoetanol 6 mM y KCl 1 M. El volumen de lecho en ambas cromatografías fue de 140 ml y la velocidad de flujo de 15 ml/h recogiendo fracciones de 2,5 ml en las que se determina la actividad de la PK y se valoran proteínas por lectura directa a 280 nm.

Para la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida se prepararon los geles y se hizo el desarrollo electroforético siguiendo exactamente el método descrito por DAVIS (4). Se utilizaron muestras de cuatro tipos: extracto crudo, precipitado de tratamiento con sulfato amónico (30-60 %), extracto dializado frente a EDTA 1,2 mM y eluato de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50. La cantidad de proteína en el gel no sobrepasó los 150 μ g para las tres primeras muestras y los 20 μ g para la última. La determinación de la actividad de la piruvatoquinasa en el gel se realizó inmediatamente después de terminado el desarrollo electroforético. Una vez sacados los geles del tubo, se colocan sobre portaobjetos de vidrio y se cortan en rodajas de 2,5 mm que se trituran en un tubo de ensayo con ayuda de una varilla de vidrio maciza y se disuelven en el tampón de máxima estabilidad dejándolo actuar durante 1 h a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo se determinó la actividad de la PK en los macerados así obtenidos y previamente filtrados por medio de una pipeta Pasteur, cuyo extremo capilar se había recubierto con filtros de algodón.

Resultados

Distribución de la piruvatoquinasa. La máxima actividad específica corresponde al pie. La tabla I muestra las actividades

Tabla I. Actividades y distribución de piruvatoquinasa de mejillón.

Organo	Actividad U/g tejido fresco	Actividad específica U/mg proteína
Hepatopáncreas	2,2	0,05
Manto	3,1	0,058
Pie	7,3	0,33

U = μ moles transformados/min.

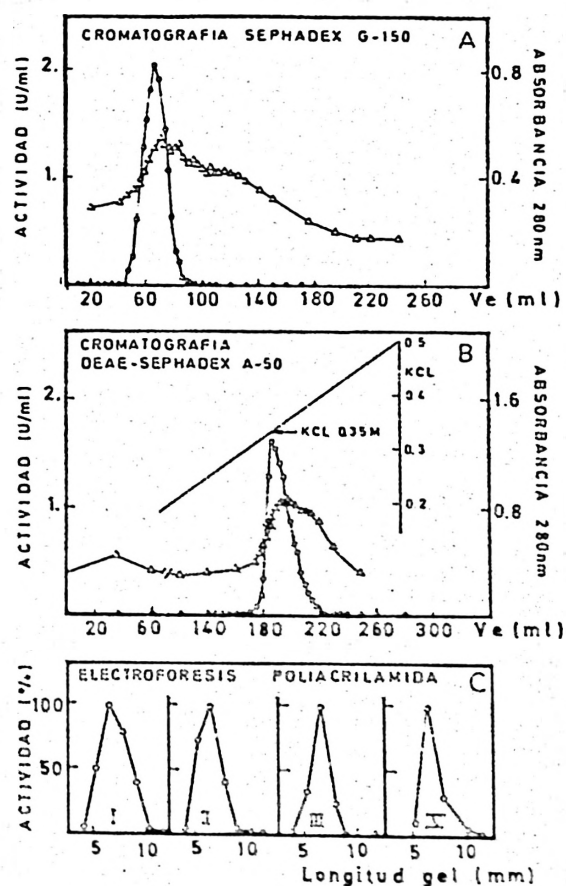


Fig. 1. Cromatografía y electroforesis de la PK de pie de mejillón.

A: en gel Sephadex G-150, B: en DEAE-Sephadex A-50, C: gel de poliacrilamida: (I) extracto crudo, (II) precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (III) extracto dializado frente a EDTA, (IV) eluato de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50.

Tabla II. Purificación parcial de la piruvatoquinasa de pie de mejillón.

	Proteínas (mg/ml)	Actividad (U/ml)	A. específica (U/mg)	Purificación (factor)	Rendimiento (%)
Homogeneizado	3,90	0,93	0,24	—	100
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	5,35	3,40	0,63	2,60	84
Dializado	1,80	1,66	0,92	3,80	82,40
<i>Cromatografía</i>					
Sephadex G-150	0,33	1,97	5,95	23	54
DEAE-Sephadex A-50	0,30	1,60	5,30	25	47

de manto, hepatopáncreas y pie de mejillón, determinadas en sus respectivos extractos.

Purificación. En la tabla II se muestra la actividad y el grado de purificación alcanzado durante las diferentes etapas de este proceso.

Comportamiento cromatográfico y electroforético. En la figura 1 se muestran los perfiles de elución correspondientes a los dos tipos de cromatografía empleados y el comportamiento electroforético en gel de poliacrilamida utilizando en este caso cuatro muestras con diferente grado de purificación. En todos los casos se observa un solo pico claro de actividad piruvatoquinásica.

Actividad y estabilidad de la enzima en función del pH y de la temperatura. La PK de pie de mejillón presenta una zona de pH de máxima actividad (7-7,5) no detectándose actividad a pH menor de 4,5 y siendo ésta muy débil a pH 11 (fig. 2 A). Respecto a la estabilidad, la enzima mantiene el 100 % de su actividad durante 15 min a 37 °C para valores de pH comprendidos entre 7 y 9.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima al pH de máxima actividad (7,5) ha permitido calcular un valor para la energía de activación, de 23 kJ/mol y un coeficiente Q_{10} de 1,4

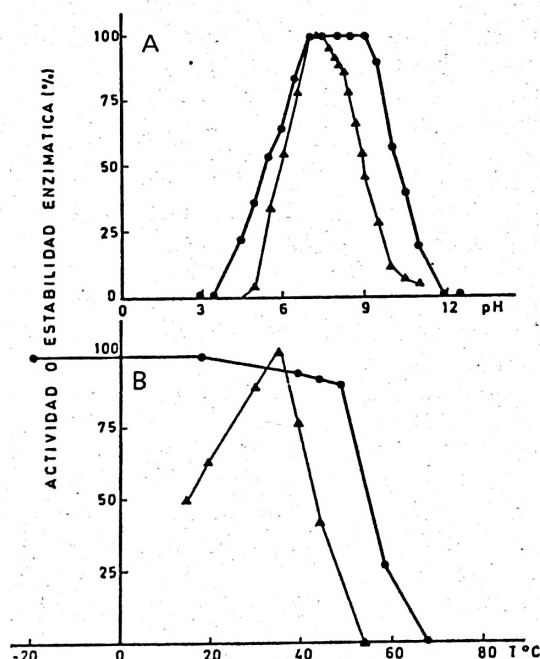


Fig. 2. Actividad y estabilidad de la PK de pie de mejillón.

A: en función del pH. B: en función de la temperatura. (●) Estabilidad. (▲) Actividad. Los puntos representados corresponden al valor medio de al menos tres experimentos.

(fig. 2 B). La enzima es completamente estable durante 5 min a pH 7,5 hasta 50 °C y se inactiva totalmente a 70 °C en las condiciones señaladas. El valor

deducido para la temperatura de semiinactivación es de 57,5 °C.

Conocido el valor de la temperatura de semiinactivación, se determinó la actividad residual a esta temperatura en función del tiempo, utilizando extracto crudo y enzima parcialmente purificada. En ambos casos se obtienen dos curvas que presentan dos tramos con diferente pendiente (fig. 3).

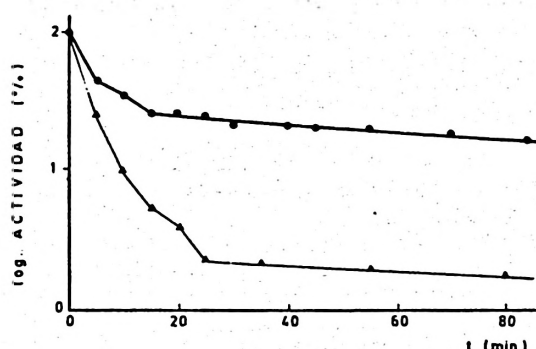


Fig. 3. Actividad enzimática residual a la temperatura de semiinactivación (°C) en función del tiempo.

(▲) Extracto crudo. (●) Fracción parcialmente purificada por tratamiento con sulfato amónico (30-60 %) y posterior diálisis frente a EDTA 1,2 mM.

Discusión

De los resultados expuestos se puede concluir que una mayor actividad específica de los tres órganos ensayados corresponde al pie, lo cual parece indicar una gran actividad glicolítica en este órgano, que puede desarrollar una gran tensión muscular con el consiguiente consumo energético, posiblemente procedente en su mayor parte de la utilización de glucosa. Por ello se seleccionó este órgano para el estudio de la PK.

La influencia del pH sobre la piruvatoquinasa ha sido estudiada en mejillón (*Mytilus edulis* L.) por LIVINGSTONE y BAYNE (10), los cuales encuentran una

zona de pH óptimo entre 7,5 y 8 en manto y por DE ZWAAN y HOLWERDA (16) que para músculo aductor encuentran un valor de pH óptimo de 7. Estos datos concuerdan con el valor aquí mostrado para la PK de pie de mejillón. Con respecto a la estabilidad al pH no se han encontrado datos bibliográficos para esta enzima en *Mytilus edulis* L., nuestros resultados muestran una zona de máxima estabilidad entre 7 y 9 lo cual indica que es una enzima bastante apta para ser sometida a un proceso de purificación. El valor de la energía de activación y del coeficiente Q_{10} está dentro de los límites dados para las reacciones catalizadas por enzimas e indica una cierta insensibilidad de la PK por la temperatura como es lógico esperar en un animal ectotermo.

Del comportamiento cromatográfico y electroforético se deduce la no existencia de formas isoenzimáticas de la PK del pie, dado que en todos los casos se ha obtenido un solo pico de actividad piruvatoquinásica. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por DE ZWAAN y HOLWERDA (16) para PK de músculo aductor, quienes no encuentran formas diferenciables de PK en este órgano utilizando la técnica de electroenfoque. Sin embargo, MUSTAFA y HOCHACHKA (13) encuentran, para músculo aductor de ostra (*Cassostrea gigas*), dos bandas de PK en el desarrollo electroforético y OSTERMAN y FRITZ (14) señalan también dos formas enzimáticas cromatográfica y electroforéticamente distintas para la PK de hígado de diferentes especies de mamíferos, lo cual está de acuerdo con lo señalado para la PK de hígado de rata (8). De la forma de las curvas del comportamiento de la PK a la temperatura de semiinactivación en función del tiempo, podría intuirse la posible presencia de isoenzimas, no obstante se pueden dar otras interpretaciones: que haya dos estados enzimáticos activos catalíticamente —uno el inicial o nativo y otro intermedio formado en la termoinactivación—,

con lo cual cada estado sería responsable de una pendiente; y, que a partir de un cierto tiempo de calentamiento haya un cambio conformacional de reforzamiento de enlaces hidrofóbicos entre las subunidades o estructura cuaternaria por un mecanismo de histéresis (1) que haga que la enzima se comporte como si fuese otra entidad o forma proteica.

Resumen

La actividad específica de la piruvatoquinasa en el pie del mejillón es notablemente superior a la que exhibe el manto y el hepatopáncreas. La enzima del pie muestra una zona de máxima actividad a pH comprendida entre 7 y 7,5 y es estable durante 15 min a 37 °C en un margen comprendido entre 7 y 9. El valor de la energía de activación es de 23 kJ/mol y el del coeficiente Q_{10} es de 1,4. Todos estos experimentos se realizan con extracto parcialmente purificado por tratamiento con sulfato amónico (30-60 %) y posterior diálisis frente a EDTA 1,2 mM. No se detectan formas isoenzimáticas de la piruvatoquinasa de pie de mejillón aplicando las técnicas de cromatografía en columna de gel de Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-50 y de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Bibliografía

1. BOCK, P. E. y FRIEDEN, C.: *T.I.B.S.*, **3**, 100-103, 1978.
2. BÜCHER, T. y PFLEIDERER, G.: En «Methods in Enzymology» (S. Colowick y N. O. Kaplan, eds.). Academic Press. Nueva York, 1955, vol. 1, pp. 435-440.
3. CARBONELL, J., FELIU, J. E., MARCO, R. y SOLS, A.: *Eur. J. Biochem.*, **37**, 148-156, 1973.
4. DAVIS, B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427, 1964.
5. HOLWERDA, D. A. y DE ZWAAN, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 296-306, 1973.
6. HOLWERDA, D. A., DE ZWAAN, A. y VAN MARREWIK, W. J. A.: *Netherlands J. Zool.*, **23**, 232-235, 1973.
7. IBSEN, K. H.: *Cancer Res.*, **37**, 341-353, 1977.
8. IMAMURA, K. y TANAKA, T.: *J. Biochem.*, **71**, 1043-1051, 1972.
9. IZBICKA, D. E., MASTALERZ, P. y KOCHMAN, M.: *Eur. J. Biochem.*, **114**, 565-568, 1981.
10. LIVINGSTONE, D. R. y BAYNE, B. L.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **48B**, 481-497, 1974.
11. LOWRY, O. M., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
12. MUNDAY, K. A., GILES, T. A. y POAT, P. C.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**, 403-411, 1980.
13. MUSTAFA, T. y HOCHACHKA, P. W.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3196-3203, 1971.
14. OSTERMAN, J. y FRITZ, P. J.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **44B**, 1077-1085, 1973.
15. ZWAAN, A. DE: *Comp. Biochem. Physiol.*, **42B**, 7-14, 1972.
16. ZWAAN, A. DE y HOLWERDA, D. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 430-433, 1972.
17. WALKER, P. R. y POTTER, V. R.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 4610-4616, 1973.