

Departamento de Enzimología
Centro de Investigaciones Biológicas
C. S. I. C. - Madrid

Sobre la especificidad de la fructosa-1,6-difosfatasa

por

María-Luisa Begué-Cantón* y Carlos Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 27 de febrero de 1958)

Hasta el trabajo de GOMORI (2), aparecido en 1943, los datos publicados sobre hexosadifosfatasas, y en general sobre fosfatasas alcalinas, eran en extremo vagos. Como consecuencia de ello, el desacuerdo en las opiniones permitía lo mismo creer que todos y cada uno de los esteres fosfóricos tenían su propio enzima, que suponer la inexistencia, virtualmente completa, de especificidad de substrato dentro del grupo de las fosfatasas alcalinas.

Los experimentos realizados por GOMORI llevaron a la conclusión de que, en riñón e hígado, existía una fosfatasa alcalina con una rigurosa especificidad de substrato para el fructosa-difosfato, especificidad confirmada más tarde por ROCHE y BUCHILLOUX (7). Estos autores pusieron, al mismo tiempo, de manifiesto que la fructosadifosfatasa al actuar sobre el fructosa-difosfato libera solamente el radical fosfórico fijado al carbono 1. Posteriormente, POGELL y Mc.GILVERY (6) y MOKRASCH y Mc.GILVERY (5), en trabajos sucesivos, describieron un método de purificación del citado enzima e hicieron un estudio de sus propiedades.

Nosotros, en este trabajo, nos propusimos precisar la especificidad de la hexosadifosfatasa. El estudio de su actividad y afinidad, mediante la determinación de las constantes de Mi-

* Del Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, C.S.I.C., Madrid. Becario del Patronato «Juan de la Cierva».

chaelis y constantes de inhibición frente al hexosadifosfato y análogos estructurales, nos ha permitido demostrar la existencia de una actividad selectiva sobre el grupo fosfato en posición 1 y de una gran afinidad por el grupo fosfato en posición 6, afinidad de la que se deduce que dicho grupo tiene gran importancia en la formación del complejo enzima-substrato.

Material y métodos

Los sustratos utilizados han sido: fructosa-1,6-difosfato (FDP) y fructosa-6-fosfato (F6P) de los Schwarz Laboratories; fructosa-1-fosfato (F1P) amablemente suministrado por el doctor R. K. CRANE; fructosa y L-sorbose de la Pfanstiehl Chemical Company, y glicerofosfato de la British Drug Houses.

En la preparación del enzima, a partir de hígado de conejo, se ha seguido el método de Mc.GILVERY (4). La purificación ha sido interrumpida en el paso 2, dado que la falta de actividad sobre glicerofosfato, en este paso, nos hizo deducir que ya habían sido eliminadas las fosfomonoesterasas inespecíficas acompañantes (actividad de las fosfatasas inespecíficas $< 0,1$ por 100 de la de la hexosadifosfatasa en nuestras condiciones). El preparado enzimático resultó tener una actividad de 40 micromoles/cc/15 minutos/30°. En los distintos experimentos fueron utilizadas diluciones adecuadas de este preparado en solución de cisteína 0,05 M, pH 9,5.

Los ensayos de actividad han sido realizados siguiendo las normas de Mc GILVERY (4), siendo determinado el fósforo inorgánico por el método de FISKE-SUBBAROW (1).

Resultados

Primeramente se ensayaron, como sustratos, el FDP y el F1P, y se observó el efecto de la concentración de los mismos sobre la actividad de la fructosadifosfatasa, representándose los resultados de acuerdo con LINEWEAVER y BURK (Fig. 1 y 2). Los valores de las constantes de MICHAELIS (K_m) y de las velocidades máximas ($V_{máx}$) relativas, determinadas gráficamente, se expresan en la tabla 1.

TABLA I

Substrato	K_m	$V_{máx}$ relativa	Coefficiente de * hidrólisis
FDP	$1,6 \times 10^{-4}$ M	1	1
F1P	$1,1 \times 10^{-3}$ M	0,1	$1,4 \times 10^{-2}$

* Índice de adecuación para el enzima (ver SOLS y CRANE, 8).

En cuanto al F6P, que aparece entre los productos de hidrólisis, ROCHE y BOUCHILLOUX (7) habían encontrado que no era sustrato de la hexosadifosfatasa. Nosotros confirmamos este resultado y, teniendo en cuenta que la falta de actividad no excluye la de afinidad, decidimos estudiar el F6P como presunto inhibidor del enzima. Hallamos, en efecto, que el F6P puede inhibir la hidrólisis del FDP por la hexosadifosfatasa. De la

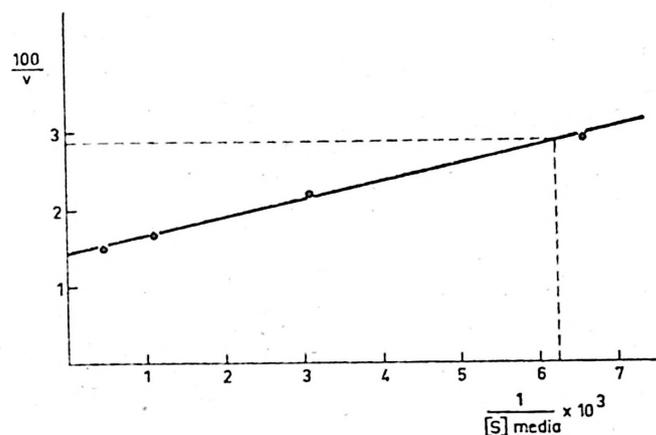


Fig. 1. — EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FDP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HEXOSADIFOSFATASA

La variación de la actividad de la fructosadifosfatasa en función de la concentración de FDP fue determinada por valoración del fósforo inorgánico liberado después de incubar a 38°, durante 1 1/2 horas, una mezcla de FDP a distintas concentraciones, comprendidas entre 1.9×10^{-4} y 2.3×10^{-3} M, y una cantidad adecuada del enzima.

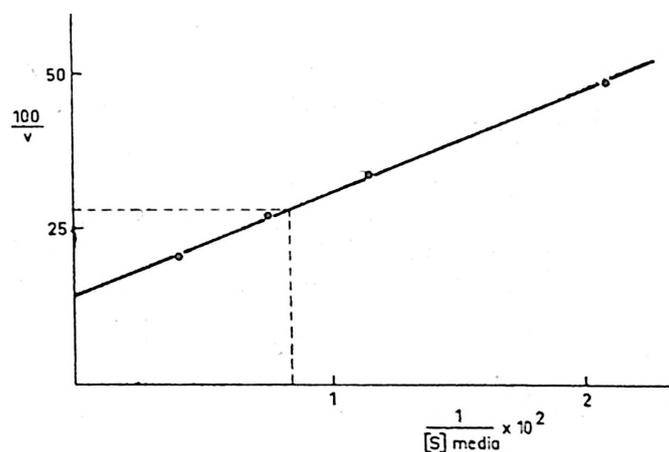


Fig. 2. — EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FIP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HEXOSADIFOSFATASA

Condiciones de ensayo: las de la Fig. 1, exceptuando las concentraciones del sustrato que en este caso están comprendidas entre 5×10^{-3} y 2.5×10^{-2} M.

representación gráfica (Fig. 3) se desprende que la inhibición es de tipo competitivo. El valor de la constante de inhibición (K_i) ha sido determinado por la ecuación :

$$K_i = K_m \frac{[I]}{\left(\frac{v}{v_i} - 1\right)(K_m + [S])}$$

resultando ser $K_i = 1 \times 10^{-2}$ M.

Teniendo en cuenta que la hexosadifosfatasa conserva afinidad significativa por el producto de la hidrólisis FDP, nos planteamos la posibilidad de que, asimismo, el enzima tuviese

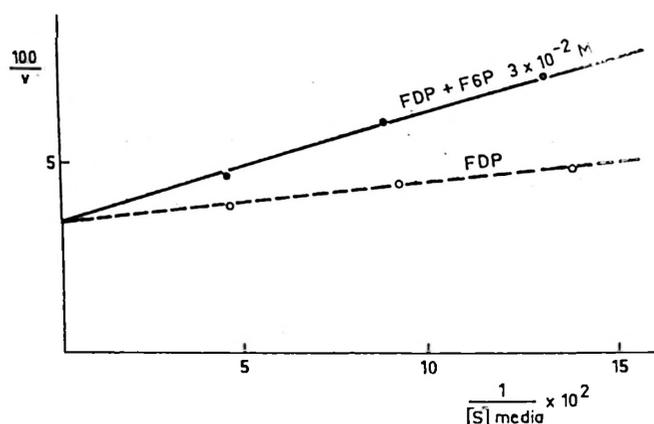


Fig. 3. -- INHIBICION DE LA HEXOSADIFOSFATASA POR F6P

Condiciones de ensayo: incubación a 30° durante 4 horas, de una mezcla de FDP a distintas concentraciones, comprendidas entre $8,33 \times 10^{-4}$ y $2,5 \times 10^{-3}$ M, F6P 3×10^{-2} M y una cantidad adecuada del enzima.

afinidad apreciable por la simple fructosa. Efectivamente se observó inhibición por fructosa, pero a concentraciones muy elevadas. Para dilucidar el posible significado de esta inhibición, estudiamos entonces el efecto de la L-sorbosa. La identidad de resultados con sorbosa y fructosa junto con el elevado orden de magnitud de la concentración requerida para apreciar inhibición (Fig. 4), sugieren que la fructosa no es inhibidor específico de la hexosadifosfatasa.

Finalmente observamos la posible afinidad de la hexosadifosfatasa por el glicerofosfato. La aparente variación de la actividad de la fructosadifosfatasa sobre FDP, en presencia de glicerofosfato, resultó ser debida a interferencia del glicero-

fosfato con el método de valoración, como puede observarse en la Fig. 5.

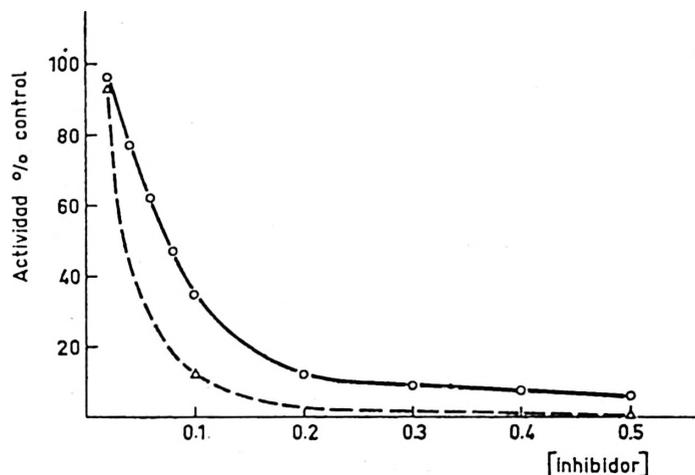


Fig. 4 — INHIBICION DE LA HEXOSADIFOSFATASA POR FRUCTOSA Y SORBOSA

○ y △ representan el efecto de la concentración de la fructosa y sorbosa, respectivamente, sobre la actividad de la hexosadifosfatasa. Condiciones de ensayo: incubación a 30° durante 4 horas, de una mezcla de FDP 8×10^{-4} M, fructosa o sorbosa a distintas concentraciones y una cantidad adecuada del enzima.

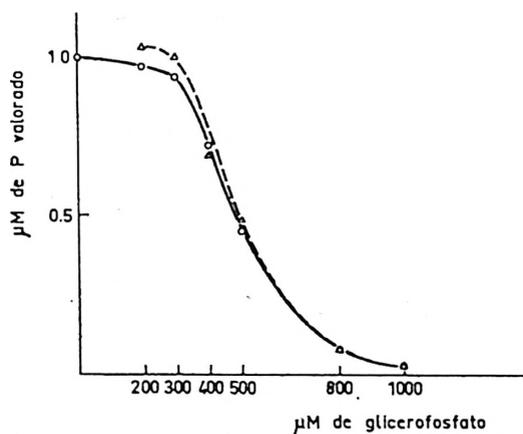


Fig. 5. — HEXOSADIFOSFATASA Y GLICEROFOSFATO

△ representa la aparente variación de la actividad de la hexosadifosfatasa sobre FDP en presencia de glicerofosfato. Condiciones de ensayo: incubación a 30°, durante 4 horas, de una mezcla de FDP 8×10^{-4} M, distintas cantidades de glicerofosfato y una cantidad adecuada del enzima.

○ demuestra la interferencia del glicerofosfato en la valoración del fósforo por el método de Fiske-Subbarow. Condiciones de ensayo: valoración de fósforo en una mezcla 1×10^{-4} M, de fosfato (aproximadamente la concentración máxima liberada a las 4 horas de la incubación anterior) y las mismas cantidades de glicerofosfato que en dicho experimento.

Discusión

Entre los compuestos ensayados en el estudio de la especificidad de la hexosadifosfatasa, los únicos sustratos encontrados han sido el FDP y el FIP. De los valores de las constantes de MICHAELIS frente a dichos sustratos y de la falta de actividad sobre el F6P que, por otra parte, según hemos demostrado, inhibe competitivamente la hidrólisis del FDP, se deduce que la fructosadifosfatasa libera selectivamente el radical fosfórico fijado al carbono 1 y que el grupo fosfato en posición 6 tiene gran importancia en la formación del complejo enzima-sustrato, si bien su ausencia no elimina la posibilidad de acción sobre el FIP.

Respecto al importante papel que juega el fosfato en posición 6, es interesante hacer resaltar su analogía con los casos de la fosfofructokinasa y las aldolasas. Después de la demostración por VILLAR-PALASÍ y SOLS (9) de que la actividad fructokinásica de la supuesta «fructokinasa» del músculo no es más que una actividad secundaria de la fosfofructokinasa, las afinidades de este único enzima por el F6P y por la fructosa evidencian la importancia de la presencia del grupo fosfato en posición 6. De modo análogo, en el caso de las aldolasas (al menos la hepática) tanto el FDP como el FIP son sustratos, si bien la afinidad por el segundo es mucho menor que por el primero (3).

* * *

Nos complacemos en agradecer al Dr. A. Sols sus valiosos consejos y crítica en el curso de esta investigación.

Resumen

Se ha delimitado la especificidad de la fructosa-1,6-difosfatasa mediante la determinación de la actividad y de la afinidad del enzima por el fructosa-1,6-difosfato, fructosa-1-fosfato, fructosa-6-fosfato, fructosa y glicerofosfato.

Los resultados obtenidos demuestran una actividad selectiva del enzima sobre el grupo fosfato en posición 1 y una gran importancia del grupo fosfato en posición 6 en la formación del complejo enzima-sustrato.

Summary

On the specificity of Fructose-1,6-Diphosphatase

The substrate specificity of liver hexosediphosphatase has been studied by the determination of the MICHAELIS constants for fructosediphosphate and several structural analogs.

From the effect of the concentration of fructose-1,6-diP and fructose-1-P on the activity of the fructosediphosphatase, K_m values of 1.6×10^{-4} and 1.1×10^{-2} M respectively have been obtained. Fructose-6-P, which is the product of the hydrolysis of the diphosphate and itself not a substrate for the enzyme, can act as competitive inhibitor. A K_i of 1×10^{-2} M has been obtained from its effect on the hydrolysis of fructose-1,6-diP. Free fructose can inhibit the enzyme at high concentrations, but this inhibition does not appear to depend on structural relation to the substrate since L-sorbose inhibits also at these high concentrations. Glycerophosphate did not inhibit the enzyme, although at high concentrations it can greatly interfere with the determination of liberated P.

From these results it can be established that the hexosediphosphatase has as its main substrate fructose-1,6-diP from which it liberates the phosphate at carbon 1. Both phosphate groups have an important but not decisive contribution to the affinity for the enzyme, so that fructose-1-P is still a substrate and fructose-6-P is a competitive inhibitor.

Bibliografía

- (1) FISKE, C. G. y SUBBAROW, Y. : *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
- (2) GOMORI, G. : *J. Biol. Chem.*, **148**, 139, 1943.
- (3) HERS, H. G. : *Le métabolisme du fructose*. Ed. Arscia. Bruselas, 1957.
- (4) MCGILVERY, R. W. : Fructose 1-6 diphosphatase from liver, en *Methods in Enzymology* (ed. por S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN), Academic Press, New York, vol. 2, 543, 1955.
- (5) MOKRASCH, L. C., y MCGILVERY : *J. Biol. Chem.*, **221**, 909, 1956.
- (6) POGELL, B. M., y MCGILVERY, R. W. : *J. Biol. Chem.*, **208**, 149, 1954.
- (7) ROCHE, J., y BOUCHILOUX, S. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 739, 1950.
- (8) SOLS, A. y CEANE, R. K. : *J. Biol. Chem.*, **210**, 581, 1954.
- (9) VILLAR-PALASI, C. y SOLS, A. : IV Jour. Biochem. Franco-Helvético-Hispano-Italiennes. Extrait des Résumés et Communications. Montpellier, 1957.

CRITICA DE LIBROS

Fieber. Unspezifische Abwehrvorgänge. Unspezifische Therapie. Profesor Dr. FERDINAND HOFF, 145 págs., 36 figuras, 16,50 D. M. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1957.

Los procesos inespecíficos de defensa, el poder curativo de la fiebre y la capacidad que posee el organismo humano de vencer con sus propios mecanismos funcionales las enfermedades, son factores que clásicamente ha tenido siempre el médico en cuenta. Los métodos de tratamiento inespecíficos desempeñan aún hoy un gran papel en la práctica médica diaria, ya que éstos sólo van encaminados a desencadenar los procesos inespecíficos de defensa del organismo enfermo.

En general, existen dos grandes direcciones terapéuticas fundamentales: la lucha directa contra los agentes etiológicos de la enfermedad y el esfuerzo de procesos naturales de defensa, que siempre deben complementarse. La lucha contra los agentes infecciosos ha logrado un gran avance con la introducción en la terapéutica de los quimioterápicos y antibióticos, en cambio la preocupación por reforzar los mecanismos orgánicos de defensa, que es un importante y clásico punto de vista médico, había sido despreciada desde hace algunos años, o por lo menos pasado muy a segundo plano, como consecuencia de los magníficos resultados obtenidos con los tratamientos específicos modernos. Algunos recientes avances en este sentido, como son el descubrimiento de los lipopolisacáridos y con ello cierta rehabilitación de la piritoterapia, el descubrimiento del properdín, que nos ha proporcionado una explicación científica de la bacteriolisis inespecífica y otros nuevos conocimientos adquiridos recientemente, han vuelto a dar actualidad a este viejo problema.

El Prof. Hoff viene estudiando de una manera sistemática desde hace 30 años los resultados de la terapéutica inespecífica y extendiendo sus investigaciones clínicas al problema del properdín y otros descubrimientos con él relacionados. En este libro el ilustre profesor alemán nos expone de manera resumida y clara las bases teóricas fisiológicas e inmunológicas, principales indicaciones y aplicaciones prácticas del tratamiento inespecífico, y especialmente de la piritoterapia, fruto de sus experiencias personales durante largos años de trabajo.

El propósito esencial de este libro es llamar la atención y reforzar la conciencia del médico práctico sobre este viejo modo de pensar, que los procesos naturales de defensa son la base sobre la que debe descansar toda intervención médica.

El libro va ilustrado con figuras muy demostrativas y termina con una bibliografía completa.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

Atención del prematuro. JORGE E. HOWARD y GRACE E. THOMPSON, con la colaboración de EILEEN D. KIERNAN R. N. Universidad de Chile, Santiago, 1957.

Es un libro patrocinado por la Oficina Sanitaria Panamericana de la Organización Mundial de la Salud. Orientado a facilitar el trabajo sanitario serio y eficaz, está lleno de detalles prácticos que revelan la experiencia propia de los autores en el conocimiento y la enseñanza de los problemas que presenta en la clínica del recién nacido. Detalla métodos de transporte, cuidados del niño, métodos necesarios de enfermería, alimentación, atención médica, enseñanza de las madres, etc. Ilustrado con profusión de fotografías muy demostrativas, es de lectura fácil, especialmente útil para el auxiliar del médico.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

Exploration de la fonction respiratoire. Bases Physiologiques et Techniques. Indications et résultats. Conférences d'Actualités Pratiques. Par H. BOUR et P. DEJOURS. -- Université de Paris. Faculté de Médecine. 52 págs. 4 figuras, 600 frs. Masson et Cie., Éditeurs. Paris-VI^e, 1956.

La exploración funcional de la función respiratoria en la actualidad se puede realizar con un conjunto de medios de investigación clínica que permiten una considerable seguridad en el estudio científico del enfermo. Estos métodos debe conocerlos el médico práctico porque, aun cuando muchos de ellos sólo son asequibles al especialista, es necesario saber valorar los datos y los resultados de la exploración. Por otra parte la importancia creciente de las técnicas con frecuencia conduce a una cierta desvalorización de los métodos más asequibles por considerarlos de menos precisión. Por todo esto es importante esta monografía que brevemente expone lo esencial de la exploración funcional del aparato respiratorio, incluyendo los aspectos más importantes de aplicación clínica. Creemos que es una buena introducción para el médico general.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

Le champ électrique du cœur normal et pathologique. PIERRE B. AVRIL. 184 págs. 73 figuras, 2 en colores. 1.800 frs. Masson et Cie., Éditeurs. Paris 1956.

Los fundamentos teóricos de la electrocardiografía están todavía sometidos a constante revisión y hacen necesarios detenidos estudios experimentales. De toda investigación en este terreno se pueden desprender aplicaciones a la interpretación del electrocardiograma normal y patológico. Por otra parte los estudios experimentales sólo se pueden realizar adecuadamente partiendo de un análisis crítico de las técnicas de trabajo en animales de experimentación. Y en una materia tan importante en la clínica es necesario también una valoración cuidadosa de los datos experimentales en relación con sus posibles generalizaciones a la observación en el hombre. El libro que comentamos aporta datos de interés para los investigadores que se ocupan de estos problemas en la experi-

mentación. A esto une interpretaciones teóricas y nuevas sugerencias. En el primer capítulo expone la anatomía descriptiva y topográfica del corazón de perro, detalla las características del electrocardiograma normal de perro, exponiendo los resultados personales después de una revisión de los datos de la bibliografía. Expone las técnicas experimentales describiendo detenidamente la preparación del animal, las comprobaciones anatómicas en relación con los datos eléctricos, el método de producción de una lesión focal, estudiando histológicamente la lesión y sus consecuencias electrofisiológicas, y termina la primera parte con el estudio de los montajes eléctricos y los aparatos de registro. Dedicó la segunda parte al estudio del campo eléctrico cardíaco, primero en el corazón normal, seguido de un estudio en el corazón patológico y, finalmente, el campo del corazón aislado in situ. La tercera parte es un ensayo de coordinación entre los resultados obtenidos y las consideraciones teóricas expuestas para la representación esquemática de la actividad eléctrica del corazón.

El libro está ilustrado con profusión de láminas, un total de 73 figuras con algunas fotografías en colores.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

Metabolismo de los hidratos de carbono en el hígado. Dr. HERMANN NIEMEXER. Universidad de Chile, Santiago, 1955.

En esta monografía el autor estudia el metabolismo hidrocarbonado en el hígado sobre la base de sus investigaciones personales, recopilando datos experimentales propios, en buena parte ya publicados, completándolos con resultados también propios aún inéditos. Dedicó dos capítulos fundamentales al estudio de la función hepática en el metabolismo hidrocarbonado, y a la exposición breve pero completa de los conocimientos actuales sobre el metabolismo intermediario de los glúcidos. El trabajo es una interesante aportación a la fisiología del metabolismo hidrocarbonado, interesante para el fisiólogo como para el bioquímico especializado en estas materias, aunque con el inconveniente de que presente una cierta desproporción en la extensión de materias, como es inevitable en un trabajo que tiene como fundamento estudios personales. Reúne una extensa bibliografía que permite ampliar todo lo tratado en el libro y completar algunos puntos que se citan de una manera más breve.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

El tífus murino y otras rickettsiasis. Dr. ROQUE KRALJEVIC. Universidad de Chile, Santiago, 1957.

Esta monografía es el trabajo presentado por su autor para optar al título de Profesor extraordinario de enfermedades infecciosas. Es el resultado de un estudio sistemático de 278 casos de tífus murino estudiando sistemáticamente las características clínicas, y los datos de laboratorio según una extensa experiencia personal. Por eso constituye una interesante aportación de útil lectura para cuantos se dediquen al estudio de las enfermedades infecciosas. Termina con una extensa bibliografía.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS

La alimentación de las poblaciones. Dr. JORGE MARDONES. Universidad de Chile, Santiago, 1957.

El libro está destinado al estudio de los problemas que crea la alimentación deficiente de las poblaciones, prescindiendo de otros aspectos como la transmisión de enfermedades. Estudia el valor energético de la dieta con las consecuencias del déficit energético, las proteínas de la dieta con las alteraciones ocasionadas con una mala alimentación proteica, la insuficiencia del aporte de vitaminas y sales minerales, todo ello expuesto de una manera clara y concisa en los primeros capítulos, citando la bibliografía fundamental. Estudia después la distribución de los trastornos de origen alimenticio en una población planteando el problema de la alimentación de las poblaciones, con orientaciones sobre las medidas más importantes para resolverlo, analizando las dificultades para poner en práctica estas medidas. El libro, de fácil lectura, puede ser interesante también para el público no médico.

Prof. J. JIMÉNEZ-VARGAS