

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Propiedades de dos fosfatasas de hígado de oveja

por
J. Prous y F. Ponz

(Recibido para publicar el 9 de enero de 1963)

Mediante un método original (12) se ha conseguido obtener, a partir de hígado de oveja, un preparado de fosfohidrolasa de monoéster del ácido ortofosfórico con óptimo de actividad a pH 9,8 y otro con pH óptimo 6, con purificación de unas 600 y 1.000 veces respectivamente.

Era de interés investigar algunas propiedades y diferencias de comportamiento de estas dos fosfatasas respecto de distintos efectores.

Material y métodos

El material y la técnica de purificación han sido los que se refieren en un trabajo previo (12). La actividad se mide en μg de P por mg de N proteico y por minuto liberados de los sustratos β -glicerofosfato sódico, fenilfosfato sódico o ciclohexilfosfato sódico, a 38°. Este último sustrato se preparó por fosforilación del ciclohexanol con oxiclورو de fósforo, siguiendo indicaciones del doctor MONCHE*. Todas las determinaciones se han hecho por los mismos métodos descritos previamente (12), con soluciones amortiguadoras de acético-acetato 0,2 M (18) para la actividad a pH ácido y glicocola-NaOH 0,2 M (14) para la alcalina, y con tiempos de incubación de 15 minutos.

(*) Agradecemos al doctor J. Monche sus indicaciones verbales.

Resultados

1. Actividad según el pH

En la figura 1 se ven las curvas de actividad de ambos preparados en función del pH, frente al sustrato β -glicerofosfato sódico 0,02 M. En nuestras condiciones de trabajo, los pH óptimos respectivos son efectivamente 6,0 y 9,8.

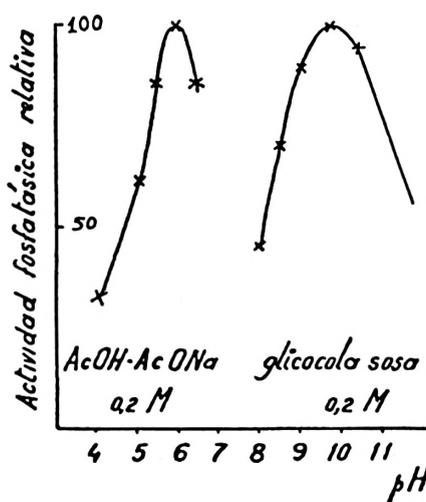


FIG. 1. Curvas actividad/pH de las dos fosfatasas, frente al sustrato β -glicerofosfato sódico 0,2 M (actividad en el óptimo = 100). Tiempo de incubación: 15 minutos.

2. Estabilidad térmica

Si una solución que contiene fosfatasa alcalina (pH 9,8) y fosfatasa ácida (pH 6), tal como la que corresponde a la fase 6 del proceso de purificación (12), se mantiene a 100° durante 2 minutos a pH aproximadamente neutro, desaparece totalmente la actividad a pH alcalino, mientras que se conserva un 50 % de la actividad a pH 6. La curva de la fig. 2 muestra la distinta pendiente de la inactivación térmica para ambos enzimas cuando se someten durante 2 minutos a las temperaturas que se indican. Claramente se ve la mayor termolabilidad de la fosfatasa alcalina.

3. Efectores

Se ha ensayado la acción del Mg^{++} ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 0,02 M), F^- (NaF 0,01 M), Cu^{++} ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,0002 M), CN^- (KCN 0,01 M), DL-tartrato ($C_4H_4O_6K_2$, $1/2 H_2O$, 0,01 M) y EDTA

($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_3$ 0,01 M). Los pH eran controlados inmediatamente antes de la adición del enzima. Los resultados se resumen en la tabla I.

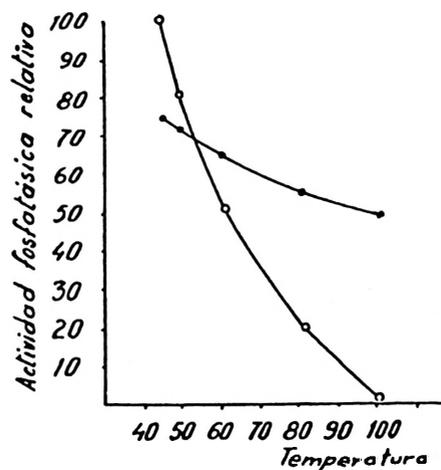


FIG. 2. Estabilidad térmica de las dos fosfatasas. Mantenimiento a la temperatura que se indica durante 2 minutos y enfriamiento rápido a la temperatura ambiente. Sustrato: β -glicerofosfato sódico 0,2 M.

- Actividad fosfatásica alcalina (pH 9,8).
- Actividad fosfatásica ácida (pH 6).

TABLA I

Influencia de diversos efectores sobre dos fosfatasas hepáticas. Las variaciones de actividad, frente al β -glicerofosfato sódico 0,2 M, se refieren como activaciones (+) o inhibiciones (—) en tanto por ciento de la normal en ausencia de efectores

Efectores	Variaciones de actividad (%)	
	Fosfatasa ácida pH 6	Fosfatasa alcalina pH 9,8
Mg ⁺⁺ 0,02 M	—10	+50
F ⁻ 0,01 M	—22	—
Cu ⁺⁺ 0,0002 M	—77	—20
Tratamiento térmico 2 min. 100°	—50	—100
DL Tartrato 0,01 M	—40	—
CN ⁻ 0,01 M	—	—10
EDTA 0,1 M	—	—60

A las concentraciones que se indican el Mg^{++} activa notablemente a la fosfatasa alcalina mientras que acaso inhibe ligeramente a la ácida. El F^- y tartrato inhiben a la fosfatasa ácida y no tienen acción sobre la alcalina. El Cu^{++} inhibe mucho más fuertemente a la fosfatasa ácida (80 %) que a la alcalina (20 %).

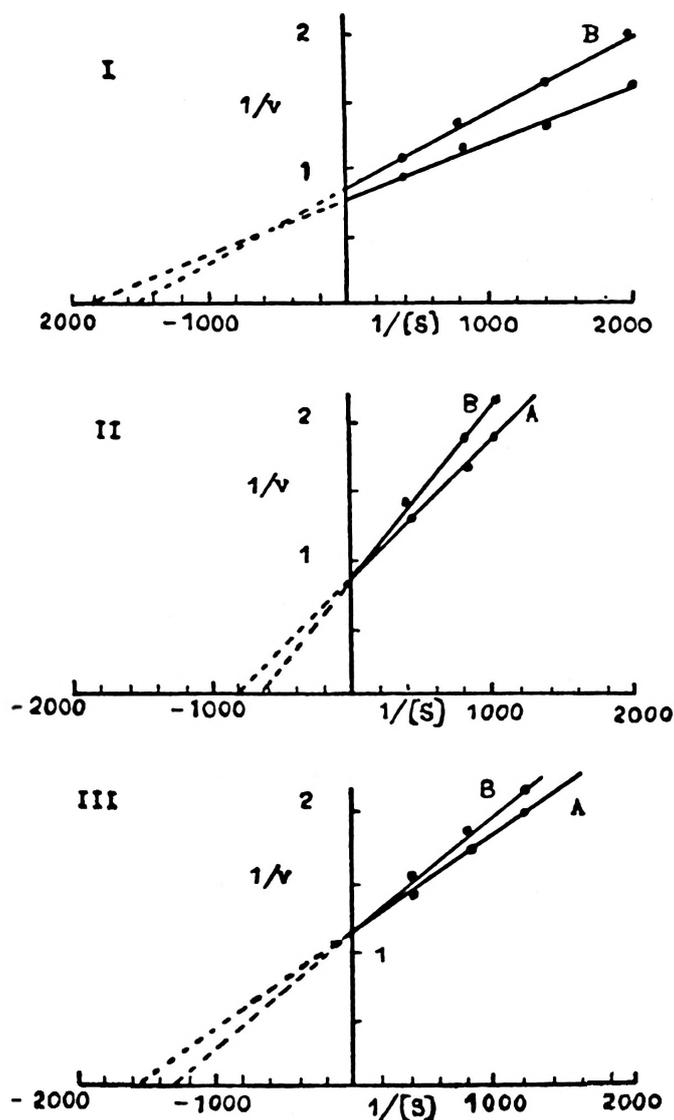


FIG. 3. Determinación de los K_m de las fosfatasas ácidas (A, pH 6, acético-acetato 0,2 M) y alcalina (B, pH 9,8, glicocola-sosa 0,2 M) frente a diversos sustratos. I) Fenilfosfato sódico. II) β -glicerofosfato sódico. III) Ciclohexilfosfato sódico.

El CN^- no actúa sobre la ácida e inhibe ligeramente a la alcalina. El EDTA inhibe fuertemente a la fosfatasa alcalina sin que tenga acción sobre la ácida.

4. Constantes de Michaelis

Se han determinado las constantes de Michaelis de ambas fosfatasas respecto de los sustratos fenilfosfato sódico, β -glicerofosfato sódico y ciclohexilfosfato sódico. Se ha seguido la expresión de LINEWEAVER y BURKE (10) de acuerdo con el procedimiento gráfico de DIXON (3). La figura 3 muestra los resultados obtenidos con los tres sustratos y la tabla II reúne los correspondientes valores de K_m .

TABLA II

Valores de K_m de las fosfatasas alcalina (glicocola-NaOH 0,2 M, pH 9,8) y ácida (acético-acetato 0,2 M, pH 6) respecto de distintos sustratos, calculados gráficamente.

Sustratos	K_m (moles)	
	pH 9,8	pH 6
Ciclohexilfosfato sódico	$5,2 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-4}$
Fenilfosfato sódico	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$
β -glicerofosfato sódico	$6,5 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-4}$

En las gráficas se observa que los valores de V (velocidad máxima) de ambas enzimas para el fenilfosfato sódico y el β -glicerofosfato sódico son casi iguales (aprox. 1,2, ya que $1/V$ es aprox. 0,8) mientras que son algo más bajos para el ciclohexilfosfato sódico (aprox. 0,9, ya que $1/V$ es aprox. 1,1).

Discusión

La fosfatasa con pH óptimo 6 no parece identificarse con una actividad accesoria de la glucosa-6-fosfatasa hepática. Efectivamente, este último enzima resultaba notablemente lábil a pH ácido, a la temperatura y a tratamientos con acetona (4, 15) mientras que el que estudiamos nosotros resiste bien el pH 4 durante el tiempo de tratamiento con resinas de intercambio iónico (12), conserva un 50 % de su actividad aun después de estar 2 minutos a 100° y no se desnaturaliza por la precipitación con acetona al 60 %. Corresponde más bien a la actividad de una fosfatasa de amplia especificidad citada por GOODLAND (8) y FANTL (5), pero que no había sido purificada todavía. Tam-

bién parece diferente de la fosfatasa de eritrocitos con semejante pH óptimo, ya que, aunque ambas tienen de común la inhibición por el Cu^{++} (2), no afectarse por el CN^{-} (17) y ser sólo ligeramente inhibida por el F^{-} , difieren en que la de eritrocitos es activable por Mg^{++} (1) y no es inhibida por el tartrato (2). Algunas propiedades, al menos de la fosfatasa ácida de hígado, coinciden con la de próstata (16) en no inhibirse por EDTA ni CN^{-} e inhibirse fuertemente por el tartrato (9, 16), pero es bastante menos sensible al F^{-} que la última (13). De acuerdo con estos resultados habría de revisarse la creencia de que la única fosfomonoesterasa ácida animal inhibible por tartrato sea la de próstata (6)

La fosfatasa alcalina hepática a su vez se comporta de acuerdo con el tipo I de la clasificación de FOLLEY (7) en cuanto a pH óptimo de actividad, activación con Mg^{++} e inhibición con CN^{-} .

Es notable la mayor termolabilidad de la fosfatasa con pH óptimo 9,8 frente a la de pH 6. También los efectores ensayados han mostrado distintas acciones sobre ambos preparados. La inhibición de la fosfatasa alcalina con EDTA puede atribuirse a la fijación del Mg^{++} dado que el enzima es activable por este ion a diferencia del preparado con pH óptimo 6, aun cuando también puede deberse a la sustracción de otros metales necesarios para el enzima (11).

El examen de las constantes de Michaelis de ambas enzimas para distintos sustratos permite reconocer una afinidad decreciente en el sentido fenilfosfato sódico > ciclohexilfosfato sódico > β -glicerofosfato sódico, aunque las diferencias entre los dos primeros sustratos son pequeñas. En todos los casos el enzima con pH óptimo 9,8 presenta una afinidad algo mayor para el sustrato que el enzima con pH óptimo 6. Los órdenes de magnitud de los K_m hallados frente al β -glicerofosfato sódico son parecidos a los citados para fosfatasa de próstata (16) con la misma solución amortiguadora.

Resumen

Se estudian algunas propiedades de dos fosfatasas extraídas de hígado de oveja con óptimo de actividad a pH 9,8 y 6, purificadas unas 600 y 1.000 veces respectivamente. Se han obtenido las curvas de actividad según el pH . La fosfatasa alcalina se inactiva totalmente a 100° (2 minutos), mientras que la activa a pH 6 es más estable. La primera se activa por el ion Mg^{++} , se inhibe fuertemente por tratamiento con EDTA y ligeramente con CN^{-} y Cu^{++} . La segunda no se activa con Mg^{++} y se inhibe mucho por el Cu^{++} , tartrato y F^{-} . El enzima activo a pH 6 no es identificable con la glucosa-6-fosfatasa de hígado, ni con la de eritrocitos, mientras que se inhibe por el tartrato como la de próstata. La fosfatasa alcalina muestra algunas propiedades coincidentes con el tipo I de FOLLEY. Se determinan los K_m de ambas enzimas para los sustratos fenilfosfato sódico, β -glicerofosfato sódico y ciclohexilfosfato sódico.

Summary

Properties of two phosphatases from sheep's liver

Some properties are studied of two ortophosphoric monoester phosphohydrolases, extracted from sheep's liver, with optimal activity at pH 9,8 (alkaline phosphatase) and pH 6 (acid phosphatase), purified about 600 and 1.000 times respectively. The curves of activity have been obtained against β -glycerophosphate according to the pH (Fig. 1). The alkaline phosphatase is completely inactivated at 100° (2 min.), while the acid phosphatase is more stable (Fig. 2). The alkaline phosphatase is activated by Mg^{++} , strongly inhibited by EDTA, only slightly inhibited by Cu^{++} and not at all by F^- . The acid phosphatase is not activated by Mg^{++} , it is very much inhibited by Cu^{++} and tartrate, less inhibited by F^- and is not affected by CN^- nor by EDTA (Table I). The acid phosphatase is not to be identified with the glucose-6-phosphatase of liver, nor with that of erythrocytes, while it is inhibited by tartrate like that of prostate. The alkaline phosphatase exhibits some properties which coincide with Folley's type I. The K_m of both enzymes have been determined, with phenyl phosphate, cyclohexyl phosphate and β -glycerophosphate as substrates (K_m between $5,2 \times 10^{-4}$ M and $1,6 \times 10^{-3}$ M).

Bibliografía

- (1) ABDUL-FADL, M. A. M. and KING, E. J. : *Biochem. J.*, **44**, 428, 1949.
- (2) ABDUL-FADL, M. A. M. and KING, E. J. : *Biochem. J.*, **45**, 51, 1949.
- (3) DIXON, M. : *Biochem. J.*, **55**, 161, 1953.
- (4) DUVE, H. : *1st. Intern. Cong. Biochem.*, abstracts, **401**, 1950.
- (5) FANTL, P. and ROME, N. : *Australian J. Exp. Biol. Med. Sc.*, **23**, 21, 1945.
- (6) FISHMAN, W. M. and LERNER, L. : *J. Biol. Chem.*, **200**, 89, 1953.
- (7) FOLLEY, S. J. and KAY, H. D. : *The phosphat.*, *Ergebn. Enzymforsch.*, **5**, 159, Leipzig, 1940.
- (8) GOODLAND, G. A. G. and MILLS, G. T. : *Biochem. J.*, **66**, 346, 1957.
- (9) KILSHEINER, G. S. and AXELROD, R. : *J. Biol. Chem.*, **227**, 879, 1957.
- (10) LINEWEAVER, H. and BURKE, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
- (11) MATHIES, J. C. : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1121, 1958.
- (12) PONZ, F. y PROUS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 171, 1962.
- (13) REINER, J. M., TSUBOI, K. K. and ANDSON, P. B. : *Arch. Biochem.* **56**, 165, 1955.
- (14) SORENSEN, S. P. : *Biochem. Z.*, **21**, 131, 1909.
- (15) SWANSON, M. : *J. Biol. Chem.*, **184**, 647, 1950.
- (16) TSUBOI, K. and HUDSON, P. B. : *Arch Biochem. Biophys.*, **55**, 191, 1955.
- (17) TSUBOI, K. and HUDSON, P. B. : *Arch Biochem. Biophys.*, **55**, 206, 1955.
- (18) WALPOLE, G. S. : *J. Chem Soc.*, **105**, 2501, 1914.