

Carmen Veríssima Ferreira

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO- QUÍMICA DE FOSFATASES ÁCIDAS PURIFICADAS DE SEMENTES DE SOJA

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

9909909

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Es.
TOMBO BC/	37520
PROC	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/99
N.º CPD	

CM-00122779-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Ferreira, Carmen Veríssima

F414c Caracterização cinética e físico-química de fosfatases
ácidas purificadas de sementes de soja/ Carmen Veríssima
Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
113f: ilus.

Orientador: Hiroshi Aoyama

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Fosfatases. 2. Soja. 3. Enzima. 4. Sementes. I. Aoyama,
Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Carmen Veríssima Ferreira

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO-QUÍMICA DE FOSFATASES ÁCIDAS PURIFICADAS DE SEMENTES DE SOJA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)

Carmen Veríssima Ferreira

e aprovada pela Comissão Julgadora.

05/03/99

Leandro Fojanire

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências.

1999

LOCAL E DATA: Campinas, 05 de Março de 1999.

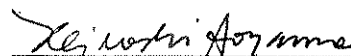
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

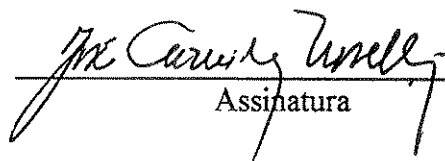
Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

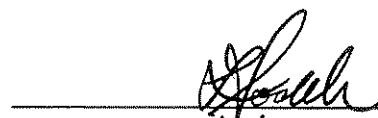
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novelo
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Fisiologia
Vegetal


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Nilce Correa Meirelles
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

SUPLENTES:

Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica


Assinatura

Aos meus pais, que além de me darem a oportunidade de chegar até aqui, foram responsáveis pela minha formação como um todo;

Aos meus irmãos, pela amizade e companherismo;

À Patrícia, minha “irmã de coração”, pela força, estímulo e grande amizade;

Dedico este trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, pela orientação e acima de tudo pela sua capacidade de formar um aluno de pós Graduação independente e capaz de exercer suas atividades profissionais futuras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Doutorado e auxílio pesquisa.

Ao assessor da FAPESP que acompanhou este trabalho e deu ótimas sugestões.

Aos profs. Nilce Correa Meirelles, José Camillo Novelo, Ladaslav Sodek e Sérgio Marangoni pela participação no exame de qualificação, correções da tese e sugestões.

Aos Profs do Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP, por fazerem parte da minha formação.

Aos ex e atuais companheiros de laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica/UNICAMP, pela agradável convivência e pelas discussões sobre as fosfatases.

Às secretárias do departamento de Bioquímica/UNICAMP: Marina, Myrian e Andréia pela disponibilidade.

Ao chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Prof. Elizeu Antunes dos Santos, por ter permitido meus afastamentos para conclusão desta tese.

Aos demais Profs. do Departamento de Bioquímica da UFRN pelo apoio.

Aos alunos de Iniciação Científica do Departamento de Bioquímica/UFRN: Araceli, Cristiane e Sandro pelo trabalho árduo e dedicado com as fosfatases.

À Jeová, secretário do departamento, pela amizade e eficiência.

À Doracy, secretária do departamento, pela amizade.

Aos demais funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRN pela disponibilidade.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
Fosfatases Ácidas X Fosfatases Alcalinas	2
Distribuição da Fosfatases Ácidas	4
Localização Celular das Fosfatases Ácidas de Plantas	5
Papel Fisiológico	7
Propriedades Físico-Químicas	9
Propriedades Cinéticas	10
Fosforilação e Desfosforilação	12
Importância do Estudo das Fosfatases Ácidas de Plantas	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.2. Métodos	16
3.2.1. Determinação do Ponto Isoelétrico	16
3.2.2. Análise Qualitativa de Metais	17
3.2.3. Determinação de Carboidratos Totais	17
3.2.4. Determinação da Atividade Enzimática	17

3.2.5. Determinação da Constante de Inibição (K_i)	19
3.2.6. Determinação dos Parâmetros Cinéticos	20
3.2.7. Efeito da Temperatura	20
3.2.8. Efeito de Açúcares	21
3.2.9. Especificidade por Substratos	22
3.2.10. Efeito do pH	22
3.2.11. Efeito de Diferentes Compostos	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
Determinação do Ponto Isoelétrico	25
Análise Qualitativa de Metais	32
Determinação de Carboidratos Totais	32
Temperatura	36
Inibidores	46
Lectinas	60
Substratos Fisiológicos	67
5. CONCLUSÃO	95
6. PERSPECTIVAS	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE	113

ABREVIATURAS

β-Naftil-P	β -Naftil-Fosfato
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
AP	Fosfatase Ácida
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
ConA	Concanavalina A
DEAE-Sephadex	Dietilaminoetil-Sephadex
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
E.Pi	Complexo Enzima.Fosfato
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Glic6P	Glicose-6-Fosfato
Frut6P	Frutose-6-Fosfato
M_r	Massa Molecular Relativa
pNP	p-Nitrofenol
pNPP	p-Nitrofenil Fosfato
Piridoxal-5P	Piridoxal-5-Fosfato
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pCMB	p-Cloromercuribenzoato
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato Inorgânico
pI	Ponto Isoelétrico
PPi	Pirofosfato Inorgânico
PTPP	Fosfotirosina-Proteína Fosfatase
Ser	Serina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SP-Sephadex	Sulfopropil-Sephadex
TEMED	N,N,N',N',-Tetrametiletilenodiamina
Thr	Treonina
Tyr-P	Tirosina-Fosfato
UE	Unidade Enzimática
V_{max}	Velocidade Máxima

RESUMO

As quatro isoformas de fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja quiescentes foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico e cinético. As isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B apresentaram pontos isoelétricos de 4,9, 5,7, 9,8 e 7,4, e quantidade de carboidratos totais de 30, 25, 18 e 10%, respectivamente. Somente as isoformas AP1 e AP3A apresentaram ferro em suas estruturas. As 4 isoformas apresentaram alta atividade catalítica à 80 °C quando o pNPP foi utilizado como substrato, no entanto, quando TyrP foi utilizada, esta temperatura foi de 60 °C e para o Ppi a temperatura máxima foi em torno de 60 °C para as isoformas AP1, AP2 e AP3B e de 50 °C para a isoforma AP3A. Estudos de estabilidade térmica foram realizados pré incubando-se as isoformas na ausência do substrato. Todas as isoformas perderam 20% da atividade quando pré incubadas a 60 °C por 60 min. A 70 °C as isoformas AP3A e AP3B mantiveram 30% de atividade residual. Todas as isoformas foram inativadas quando pré incubadas a 80°C. Estudos de estabilidade térmica na presença de alguns possíveis protetores, mostraram que os produtos da reação com o pNPP (pNP e fosfato) eram responsáveis pela estabilização de todas as isoformas, favorecendo a alta atividade catalítica a 80 °C.

As 4 isoformas não foram significativamente afetadas por compostos que interagem com grupos -SH (pCMB, H₂O₂, Cu²⁺), indicando a ausência de tais grupos no sítio ativo. Piridoxal fosfato também não apresentou efeito inibitório, o que mostra que estas enzimas não contêm resíduos de lisina essenciais para catálise.

Todas as isoformas foram inibidas competitivamente pelo fosfato, vanadato, pervanadato, fluoreto e molibdato. A determinação das constantes de inibição (K_i) revelou que o molibdato é o inibidor mais potente para todas as isoformas. A ConA apresentou efeito ativador somente para a isoforma AP1, o qual era dependente do substrato utilizado.

As isoformas AP1 e AP2 mostraram uma maior especificidade por substratos que AP3A e AP3B. Foram realizados estudos cinéticos detalhados utilizando-se PEP, PPi, TyrP, Glic6P e Frut6P como substratos. Os resultados cinéticos mostraram que estas isoformas poderiam participar em diferentes rotas metabólicas.

SUMMARY

The four isoforms of acid phosphatase (AP1, AP2, AP3A and AP3B), purified from mature soybean seeds, had their physico-chemical and kinetic properties determined. The AP1, AP2, AP3A and AP3B isoforms presented isoelectric points of 4.9, 5.7, 9.8 and 7.4 and total carbohydrate of 30, 25, 18 and 10%, respectively. Among the four isoforms only AP1 and AP3A presented iron in their structures. The four isoforms of soybean seeds acid phosphatases presented high activities, even at temperatures above 80°C when pNPP was utilized as substrate. On the other hand, lowest optimum temperature values were obtained using other substrates. With tyrosine phosphate, the maximum activity was observed at 60 °C, and when PPi was used as substrate, the optimum temperature values were 60 °C for AP1, AP2 and AP3B, and 50 °C for AP3A. In order to investigate the thermal stability of the four acid phosphatases, the enzymes were preincubated in the absence of substrate. The four isoforms lost only 20% activity at 60°C, after 60 min; the isoforms AP3A and AP3B retained 30% of activity at 70°C, after 60 min; all the isoforms were inactivated at 80°C, after 5 min. In order to verify whether the enzymatic forms could be protected against thermal inactivation, we tested some compounds with different characteristics. The best protective effect was observed when the enzymes were incubated in the presence of both reaction products, p-nitrophenol and inorganic phosphate.

The soybean seeds acid phosphatases were not significantly affected by compounds that interacted with -SH residues (pCMB, H_2O_2 , Cu^{2+}), indicating the absence of such residues in the active sites. Pyridoxal phosphate had no effect, suggesting that lysine residues were not important to the enzyme catalysis.

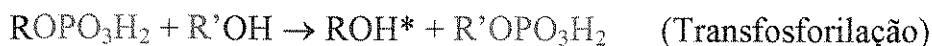
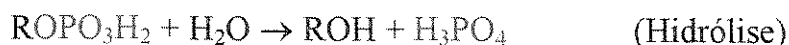
The four acid phosphatase isoforms AP1, AP2, AP3A and AP3B were competitively inhibited by phosphate, vanadate, molybdate and fluoride; inhibition constant studies showed that molybdate was the most potent inhibitor. The AP1 isoform was activated by lectin (ConA), which effect was dependent on the substrate utilized. The AP1 and AP2 isoforms showed higher substrate specificity when compared with AP3A and AP3B.

Detailed kinetic properties were studied using PEP, PPi, TyrP, Gluc6P and Frut6P as substrate. These studies suggest that these isoforms could participated in different metabolic routes.

1 - INTRODUÇÃO

Fosfatases ácidas (ortofosfato monoéster fosfohidrolases - E.C. 3.1.3.2), pertencentes à classe de hidrolases que utilizam como substratos fosfatomonoésteres, estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais (GRANJEIRO, 1994), vegetais (DUFF et alii, 1994) e em microrganismos (GONZÁLEZ et alii, 1993).

Estas enzimas podem catalizar dois tipos de reações, como indicado abaixo:



*álcoois

A reação de hidrólise é um processo termodinamicamente favorável ($\Delta G^\circ \leq -9 \text{ KJ/mol}$ e apresenta atividade máxima em pH em torno de 4,0-7,0 (VINCENT et alii, 1992). A reação de transfosforilação é comumente observada em reações catalisadas pela fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa e normalmente os aceptores de fosfato são glicerol, metanol e etanol.

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos (ROCHE, 1931), sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato, com pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase de glóbulos brancos que catalisava esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

Fosfatase Ácida X Fosfatase Alcalina

A distinção entre as fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas, inicialmente era baseada somente no pH ótimo para atividade enzimática. Posteriormente, outras características relacionadas com o mecanismo de reação ajudaram a diferenciar estas duas classes de enzimas.

NEUMAN (1968) observou que as fosfatases alcalinas além da hidrólise dos substratos usuais, catalisavam também a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosforotióico RSPO_3Na_2 do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tio-álcool correspondente. Já as fosfatases ácidas, por sua vez, catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosforotióico do tipo ROPO_2SKH , produzindo o álcool e o tiofosfato. Estes fatos nos permitem visualizar mecanismos de reação diferentes para as duas enzimas, uma vez que a fosfatase ácida requer para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato.

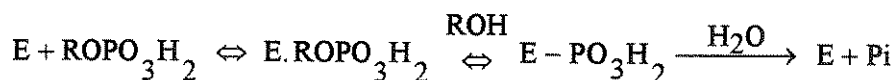
CHAIMOVICH & NOME (1970) observaram a insensibilidade das fosfatases ácidas à presença de cátions mono e divalentes no meio de reação, ao contrário das fosfatases alcalinas que requerem metais, principalmente o Mg^{2+} , para sua atividade (REID & WILSON, 1971).

VINCENT et alii (1992) propuseram outra diferença para estas duas classes de enzimas, sugerindo suas vias catalíticas:

Fosfatase Alcalina



Fosfatase Ácida



No caso da fosfatase alcalina, em pH acima de 7, o complexo E.Pi é limitante da velocidade e a espécie $E\text{-PO}_3^{2-}$ contém um grupo fosfoserina que é lábil em meio básico e estável em meio ácido, característica apropriada para esta fosfatase. No entanto, para a fosfatase ácida o complexo E.Pi não foi observado, mas provavelmente o mesmo possa ser um intermediário, uma vez que o Pi atua como um inibidor competitivo da reação enzimática. Para a fosfatase ácida de alta massa molecular da próstata e gérmen de trigo estes autores sugeriram que o intermediário ($E\text{-PO}_3\text{H}_2$) da reação seria a fosfohistidina, que é lábil em meio ácido. Para a fosfatase ácida de baixa massa molecular, embora estudos de modificação química e dependência do pH indiquem que este intermediário também seria a fosfohistidina, relatos na literatura mostram que os grupos sulfidrilas (cisteína) apresentam um papel essencial na catálise, pois estas fosfatases são fortemente inibidas por reagentes que se ligam a estes grupos (LAIDLER et alii, 1982).

Fosfatases alcalinas geralmente apresentam uma especificidade absoluta. Exemplo desta classe de fosfatases em plantas são a frutose 1,6 difosfatase citossólica e sacarose 6 fosfatase, ambas envolvidas na síntese da sacarose a partir de triose-P. As fosfatases ácidas, por outro lado, normalmente não exibem este

comportamento, podendo reconhecer uma gama maior de substratos. Como será descrito adiante, duas classes de fosfatases ácidas podem ser distintas, baseando-se em suas relativa seletividades pelos substratos, a primeira apresentando pouca ou nenhuma especificidade, e a segunda categoria, mostrando uma especificidade maior por substratos (DUFF et alii, 1994).

Distribuição das Fosfatases Ácidas

A distribuição das fosfatases ácidas na natureza é ampla. Vários aspectos destas enzimas têm sido estudados em microrganismos (LOVELACE et alii, 1986; SCHELL et alii, 1990; GONZÁLEZ et alii, 1993; HAN et alii, 1994).

As fosfatases ácidas de tecidos animais apresentam uma distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em secreções como saliva, sémen, e em diversos tecidos e órgãos tais como: próstata, placenta, testículo, cérebro, fígado, coração, baço, glândulas salivares, osso, dente, gengiva, nervos e glânglios nervosos. No sangue esta enzima pode ser detectada tanto nos eritrócitos, leucócitos como no plasma, onde algumas vezes é utilizada como meio de diagnóstico para algumas doenças (para revisão, GRANJEIRO, 1994).

Similarmente, esta ampla distribuição também ocorre no reino vegetal onde a fosfatase ácida é detectada em plantas superiores (BOROUGHES, 1954), folhas de trigo (ROBERTS, 1956), tabaco (SHAW, 1966), milho (SLACK et alii, 1969), tubérculo de batata doce (UEHARA et alii, 1974), nódulo de raízes (PENHEITER et alii, 1997), no bulbo de *Allium cepa* (cebola) (GUO & PESACRETA, 1997), no

látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira) (JACOB & SONTAG, 1974), na membrana tilacóide de *Sorghum vulgare* (sorgo) (RENGASAMY et alii, 1981), no pólen de *Brassica campestris* (mostarda) e *Lilium regale* (lírio) (STROTHER et alii, 1985), na camada aleurônica de grãos de arroz (YAMAGATA et alii, 1980) e de cevada (GABARD & JONES, 1986), coleóptiles da cevada (PASQUALINI et alii, 1992), em culturas de endosperma de milho (MIERNYK, 1992), em escutela de semente de milho em germinação (ROSSI et alii, 1981), em gérmen de trigo KAWARASAKI et alii, 1996), em sementes de amendoim (BASHA, 1984), de girassol (PARK & VAN ETEN, 1986), de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987) e de soja (ULLAH & GIBSON, 1988; FERREIRA et alii, 1998a),

Localização celular das Fosfatases Ácidas de plantas

As fosfatases ácidas de plantas podem ser encontradas tanto na parte extracelular quanto intracelular. Na primeira, podem estar localizadas na parte externa da parede celular e/ou ser secretadas pela raiz e por células em cultura (UEKI & SATO, 1977; KANEKO et alii., 1990; LEFEBVRE et alii., 1990; DUFF et alii., 1991; LEBANSKY et alii., 1992; MIERNYK, 1992). As enzimas da parede celular têm sido associadas à hidrólise de determinados substratos oferecidos externamente à célula em tecidos não danificados. O fósforo é um dos minerais mais importante para o crescimento da planta, uma vez que apresenta um papel vital no transporte de energia, regulação metabólica e constituinte de muitas biomoléculas. Consequentemente sua assimilação, estocagem e metabolismo são de crítica

importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas (DUFF et alii, 1994). Este mineral é assimilado pelos vegetais sob a forma de fosfato, o qual pode se tornar acessível através das fosfatases ácidas. As fosfatases ácidas extracelulares de raiz poderiam tornar acessível para a absorção uma quantidade adicional de fosfato inorgânico, a partir de sua liberação da matéria orgânica do solo. Neste caso, identificou-se em laboratório, que certos ésteres fosfatos (inositol hexafosfato, inosina monofosfato e glicerofosfato) seriam fontes efetivas de fosfato para o crescimento do trigo, arroz, rabanete (LEE, 1988). NINOMIYA et alii (1977) isolaram a partir da cultura de célula do tabaco uma fosfatase ácida extracelular que teve sua atividade aumentada quando cultivada em meio sem fosfato. Uma fosfatase ácida de cultura de células da folha de *Brassica nigra* (mostarda) foi purificada por DUFF et alii (1989), a qual apresentou uma alta atividade para o p-nitrofenil fosfato (pNPP), ADP, ATP, fosfoenolpiruvato (PEP) e atividade moderada para vários outros fosfatos orgânicos; devido à alta afinidade pelo PEP, estes autores a classificaram como uma fosfoenolpiruvato fosfatase. Este resultado fez com que os autores sugerissem uma possível participação desta enzima em uma via de desvio da reação catalisada pela piruvato quinase dependente de ADP em período extenso de privação do fosfato.

Já a enzima intracelular parece ser ubíqua. Através de estudos citoquímicos identificou-se estas enzimas na parede celular, retículo endoplasmático, complexo de

Golgi, mitocôndria e vacúolo (para revisão, GABARD & JONES, 1986 e LEE, 1988).

Papel fisiológico

O papel fisiológico e o mecanismo de catálise destas enzimas ainda não estão totalmente elucidados. O fato destas enzimas participarem na assimilação do fosfato, regulação de algumas proteínas por desfosforilação, degradação de metabólitos tóxicos e de vias metabólicas de desvio, faz com que elas tenham participação importante nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta. As fosfatases ácidas de plantas parecem ter importante papel, uma vez que já tem sido relatado a participação das mesmas durante o desenvolvimento e alterações ambientais em que as plantas podem ser submetidas. Dentre os fatores de desenvolvimento pode-se citar a germinação, que talvez seja um processo em que as fosfatases ácidas tenham uma grande importância, pois neste período, suas atividades estão sempre aumentadas e, algumas vezes, surge outra isoforma ativa. BISWAS & CUNDIFF (1991) purificaram 4 fosfatases ácidas (API, APII, APIII e APIV) das sementes de *Vigna sinensis* com 96 h de germinação. As frações API e APII são proteínas constitutivas, já as frações APIII e APIV só apareceram depois de 4 a 15 horas de germinação. Outros processos como florescimento, frutificação e senescência também levam a um aumento da atividade fosfatásica (DE LEO & SACHER, 1970; KANELIS et alii., 1989). A atividade da enzima pode ser aumentada também por fatores ambientais como cultivo da planta em altas

concentrações de sal, baixa concentração de fosfato e água e também em ferimentos causados à planta (DEWALD et alii, 1993; TADANO, et alii, 1993; THEODOROU & PLAXTON, 1993). PAN (1987) isolou e purificou parcialmente 3 fosfatases das folhas do espinafre, o qual foi cultivado em condições de aumento gradual da força iônica até 300 mM. Das 3 frações, somente uma apresentou um aumento da atividade, quando comparada com as folhas do espinafre cultivado em condições normais. BARRET-LENNARD et alii (1982) mostraram que fosfatases solúveis das folhas de trigo tiveram suas atividades aumentadas, cerca de 6 vezes, quando o trigo foi cultivado em condições de baixas concentrações de fosfato e água. DEWALD et alii. (1992) demonstraram que proteínas de reserva das sementes de soja (VSP α e VSP β) seriam fosfatases ácidas que além de poderem atuar sobre diferentes substratos como β -naftil-fosfato, carboxifenil-fosfato, açúcares fosfatados, gliceraldeído 3-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato, fosfoenolpiruvato, ATP, ADP, PPi e polifosfatos de cadeia curta, seriam importantes no período de desenvolvimento da soja e em respostas a estímulos externos como deficiência de água e ferimentos. STASWICK et alii (1994) purificaram uma fosfatase ácida das folhas de soja, que teve sua atividade 10 vezes aumentada depois da remoção das vagens 5 semanas após o florescimento, quando comparada com a atividade da mesma enzima em folhas da soja que tiveram as vagens retiradas na época normal.

Propriedades Físico-químicas

Em plantas, as fosfatases ácidas normalmente apresentam-se em múltiplas formas, as quais podem ter algumas diferenças nas propriedades físico-químicas (DE-KUNDU & BANERJEE, 1990; HARAGUCHI et alii, 1990; DUFF et alii, 1994), tais como:

- *Massa molecular relativa* . A massa molecular relativa de fosfatases ácidas de plantas varia de 30.000 a 300.000: 53.000 para a fosfatase ácida de cotilédones de soja (ULLAH & GIBSON, 1988); 144.000 para a de células de tabaco em cultura (KANEKO et alii, 1990); 200.000 para a de embriões de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987).

- *Ponto isoelétrico* . Geralmente o pI destas fosfatases encontra-se entre 4,3 a 6,7: 4,7 para a de proteína de estocagem de hipocotilédones de soja (DEWALD et alii, 1992); 5,8 para a de sementes de trigo em germinação (CHENG & TAO, 1989); 6,7 para a de cotilédones de soja (ULLAH & GIBSON, 1988).

- *Presença de carboidrato na estrutura* . A fosfatase ácida dos tubérculos de batata purificada por KRUZEL & MORAWIECKA (1982) apresentou cerca de 17% do peso total da enzima (66.000) de carboidratos tais como: manose (5,6%), ramnose (3,4%), glicose (2,5%), galactose (1,5%) e glicosamina (3,6%).

- *Presença de mais de uma cadeia polipeptídica* . BASHA (1984) purificou das sementes de amendoim uma fosfatase com massa molecular relativa de 240.000, sendo que a mesma era composta de 6 subunidades de 42.500. Uma fosfatase das

sementes de papoula de massa molecular relativa 106.000 mostrou tratar-se de um dímero de massas moleculares relativas 57.000 e 63.000, respectivamente (CHUNG & POLYA, 1992). A fosfatase ácida purificada de nódulos de raízes de soja (PENHEITER et alii, 1997) era um heterodímero com subunidades de 28.000 e 31.000 Da.

- *Presença de um centro metálico* . SUGIURA et alii (1981) purificaram de tubérculos da batata doce uma fosfatase ácida de cor violeta que apresentou manganês ligado à sua estrutura.

Propriedades cinéticas

Quanto às propriedades cinéticas, as fosfatases ácidas de plantas apresentam algumas características comuns:

- *Especificidade* . Fosfatases ácidas de plantas normalmente não exibem especificidade para substratos. Entretanto, estas enzimas podem ser divididas em duas categorias distintas com base na seletividade relativa pelo substrato (DUFF et alii, 1994): a primeira categoria de fosfatases ácidas, são aquelas totalmente não específicas, as quais ocorrem em uma ampla variedade de espécies e tecidos, e que apresentam consideráveis diferenças nas suas propriedades físicas. Fosfatases ácidas pertencentes à esta categoria normalmente têm predileção por ésteres fosfato, açúcares fosfatados, nucleotídeos, aminoácidos fosforilados e pirofosfato (RENGASAMY et alii; 1981; BASHA, 1984; PASQUALINI et alii, 1992). A segunda categoria de fosfatases ácidas são as chamadas enzimas especializadas, pois

têm preferência por um determinado substrato, apesar de poderem apresentar uma pequena atividade relativa para outros substratos. Encontra-se neste caso a PEP fosfatase purificada de *Brassica. nigra* (DUFF et alii, 1989) mencionada anteriormente. RANDALL & TOLBERT (1971) purificaram uma fosfatase ácida de folhas de cana de açúcar que apresentou grande especificidade para o 3-fosfoglicerato, por isto a consideraram como 3-fosfoglicerato fosfatase. ULLAH & GIBSON (1988) purificaram de cotilédones de soja uma fosfatase ácida que hidrolisou o ácido fítico (portanto, uma fitase), mas que também conseguiu hidrolisar outros compostos fosforilados.

Apesar de se saber que as fosfatases ácidas de plantas podem atuar sobre importantes intermediários metabólicos, tais como glicose-6P, frutose-6P, fosfoenolpiruvato, pirofosfato inorgânico, AMP, ATP, fosfoglicerato, não se conhece ainda qual(ais) o(s) substrato(s) fisiológico(s) e o mecanismo de reação.

- *Temperatura ótima.* Comumente encontra-se entre 50-60°C. Existem algumas exceções como a fosfatase ácida purificada a partir das sementes de algodão em germinação, a qual apresentou atividade catalítica máxima à 37 °C (BHARGAVA & SACHAR, 1987).

- *Inibição* - Parece comum a inibição por metais e fluoretos, a independência de cátion e a insensibilidade pelo tartarato (ROSSI et alii, 1981; PASQUALINI et alii, 1992). FUJISAWA et alii (1993) compararam a inibição da fosfatase ácida do fluido seminal pelo tartarato com fosfatases de tecidos de várias plantas, e observaram que aproximadamente metade das fosfatases de tecidos de plantas

superiores testadas, incluindo vegetais e frutas, não foi inibida pelo tartarato, ao contrário da fosfatase do cogumelo que apresentou uma inibição significativa quando comparada com a inibição da fosfatase ácida do fluido seminal.

Fosforilação e Desfosforilação

Paralelamente, outro aspecto de grande importância é o controle de processos metabólicos nas plantas superiores através de modificações pós-tradução, via fosforilação e desfosforilação, catalisadas pelas proteínas quinases e proteínas fosfatases (TREWAVAS, 1976; LIN & KEY, 1980; BUDDE & CHOLLET, 1988; MacKINTOSH & COHEN, 1989; CHUNG & POLYA, 1992; ARIÑO et alii, 1993; YUPSANIS et alii, 1993; SMITH & WALKER, 1996), da mesma forma como o que ocorre em animais (KREBS & BEAVO, 1979; COHEN, 1989).

Em células de mamíferos, algumas fosfatases ácidas purificadas apresentaram atividade de proteína fosfatase, mais especificamente, fosfotirosina proteína fosfatase (LAU et alii, 1987). A importância das proteínas fosfatases se deve a sua participação nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas podem regular a atividade de outras enzimas por desfosforilação (BUDDE & CHOLLET, 1988).

MacKINTOSH & COHEN (1989) relataram que as técnicas para a identificação e quantificação de proteínas fosfatases em células animais são aplicáveis para as plantas superiores. Apesar destes fatos, poucos relatos existem sobre a atividade Ser/Thr proteína fosfatase em plantas. LIN et alii (1998) relataram

um estudo de clonagem molecular e mapeamento cromossomal, em *Arabidopsis thaliana*, de Ser/Thr proteínas fosfatases tipo 1, que estão implicadas em vários processos de desenvolvimento e crescimento da planta (HAMMER et alii, 1997).

Recentemente, foi mostrado que as proteínas fosfatases, juntamente com as quinases participam da regulação da tensão de actina em células de soja (GRABSKI et alii, 1998). POLYA & HARITOU (1988), purificaram duas proteínas fosfatases do embrião do trigo, as quais hidrolisaram fosfocaseína e a histona, mas não atuaram sobre a L-Serina-P, L-Treonina-P e L-Tirosina-P. CHENG & TAO, 1989, purificaram até homogeneidade uma fosfatase neutra das sementes de trigo em germinação, que catalisou a hidrólise do pNPP e de proteínas fosforiladas em tirosina (fosfotirosil proteína fosfatase). Esta enzima (glicoproteína) apresentou uma massa molecular relativa de 35.000 e sua atividade não foi afetada por metais e altas concentrações de agentes quelantes. Estes autores relataram que esta enzima é distinta da fosfatase ácida de gérmens de trigo, uma vez que esta fosfatase neutra não hidrolisou grupos fosfoseril e fosfotreonil em proteínas. Outro fato importante, é que a enzima apresentou grande similaridade em suas propriedades com fosfotirosil proteínas fosfatases isoladas de várias fontes. A atividade desta fosfotirosil proteína fosfatase foi somente observada na germinação das sementes do trigo, o que levou estes autores a sugerir que esta enzima seria importante para o crescimento e desenvolvimento do trigo.

Em plantas algumas fosfatases ácidas têm apresentado atividade proteína fosfatase. YANG et alii (1987) identificaram múltiplas fosfatases ácidas na membrana tilacóide de folhas do trigo e GELLATLY et alii (1993) purificaram uma fosfatase ácida de tubérculos da batata com características de uma proteína tirosina fosfatase. Várias outras fosfatases ácidas purificadas de plantas mostraram atividades hidrolíticas sobre TyrP (KAWARASAKI et alii, 1996; GUO & PESACRETA, 1997).

Importância do estudo das Fosfatases Ácidas de plantas

Apesar de já conhecido que as fosfatases ácidas de plantas têm participação no metabolismo de fósforo, elemento essencial para o desenvolvimento e crescimento normal dos órgãos da planta, não se sabe realmente a função fisiológica dessas enzimas. A determinação precisa da(s) função(s) *in vivo* para fosfatases de plantas é dificultada pelos seguintes fatores:

- a heterogeneidade das fosfatases ácidas dentro de um dado tipo celular raramente permite a purificação de todas as frações contendo atividade fosfatásica.
- falta de dados cinéticos para substratos não sintéticos para a maioria das fosfatases estudadas.
- muitas fosfatases são induzidas e as condições e mecanismos para esta indução precisam ser completamente entendidos.

Além do citado acima, quando comparado com mamíferos, existem poucos trabalhos na literatura sobre fosfatases ácidas de plantas, o que torna clara a necessidade de purificar e caracterizar as múltiplas formas de fosfatases a partir de diferentes fontes e tecidos de plantas. Desta forma, essas fosfatases poderiam ser agrupadas de acordo com determinadas características (especificidade pelo substrato, inibição, ativação, efeito de cátions) como acontece com as fosfatases de origem animal, o que facilitaria o entendimento da(s) função(s) celular(es) dessa importante classe de enzimas de plantas.

2 - OBJETIVOS

- Caracterizar físico-quimicamente as 4 isoformas de fosfatases ácidas purificadas das sementes de soja quiescentes no que diz respeito ao ponto isoelétrico, presença de metal e quantidade de carboidratos;
- Estudo detalhado do efeito da temperatura. Neste sentido, será importante determinar os valores de energia de ativação, e fazer um estudo da inativação térmica das isoformas, verificando que possíveis compostos podem proteger as enzimas da inativação;
- Estudos cinéticos utilizando-se possíveis substratos fisiológicos como pirofosfato inorgânico, glicose 6P, frutose 6P, fosfoenolpiruvato e tirosina-fosfato, uma vez que ainda não foi estabelecido o substrato fisiológico para as fosfatases ácidas de plantas;

- Verificar o efeito de algumas lectinas na atividade destas enzimas utilizando possíveis substratos fisiológicos, uma vez que estas proteínas podem alterar os parâmetros cinéticos de algumas fosfatases ácidas;
- Estudo detalhado de inibidores de fosfatases ácidas. Alguns compostos como molibdato, fosfato inorgânico (Pi), vanadato e fluoreto apresentaram um forte efeito inibitório sobre as 4 isoformas (FERREIRA et alii, 1998a). Serão determinados os tipos de inibição e as constantes de inibição (K_i) para os vários compostos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

As isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B foram purificadas a partir das sementes de soja quiescentes (FERREIRA et alii, 1998a).

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Determinação do ponto isoeletrico

O ponto isoeletrico foi determinado por eletroforese, utilizando gel de poliacrilamida a 5% e anfólitos numa faixa de pH 3,5-10; 3,5-5,0; 5,0-7,0 e 7,0-9,0. A corrida foi realizada a 4°C, com voltagem de 250 volts. Foram aplicados 25 µg de proteína; a corrida foi interrompida quando a corrente chegou próximo a zero. Uma parte do gel foi corada para proteína, com comassie blue, e a outra foi cortada

verticalmente em pedaços de 0,5 cm, os quais foram colocados em frascos contendo 1 ml de água. Após agitação, mediu-se o pH do meio. Os valores de pI foram determinados através do gráfico pH x cm do gel. Medindo-se a localização da banda de proteína, pôde-se determinar o ponto isoeletrico, que foi correspondente ao pH medido na solução.

3.2.2 Análise qualitativa de metais

A análise qualitativa foi feita através da varredura do espectro de absorção (200-600 nm) da enzima diluída em tampão acetato 0,1M pH 5,0.

3.2.3 – Determinação de carboidratos totais

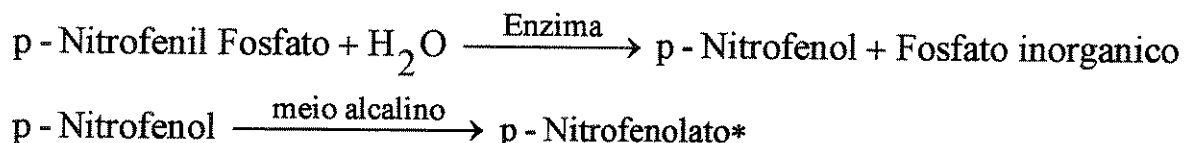
A determinação de carboidratos totais foi realizada de acordo com o método de DISHE (1954), utilizando-se 10, 35, 40 e 55 µg das isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente, fenol a 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi deixada em temperatura ambiente e logo após lida a absorbância à 480 e 490 nm.

3.2.4 - Determinação da atividade enzimática

a - Dosagem do p-nitrofenol

A atividade enzimática foi determinada a 37 °C usando p-nitrofenilfosfato como substrato, em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0) em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada 10 minutos após a adição da enzima (0,06, 0,5, 3,2 e 2,2 µg das

isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente), com 1 mL de hidróxido de sódio 1M. A absorbância foi medida a 405 nm.



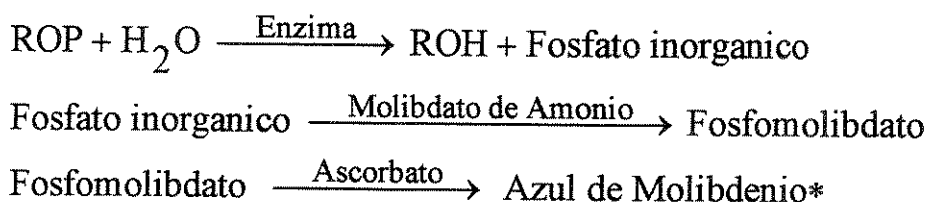
* Absorve em 405 nm

O coeficiente de extinção molar para o p-nitrofenolato é $18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

b - Dosagem do fosfato

Quando outros substratos foram utilizados, a atividade enzimática foi determinada dosando-se o fosfato liberado. A reação foi paralisada 10 minutos após a adição da enzima, com 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molíbídico foi adquirida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0) como redutor, de acordo com o método descrito por LOWRY & LOPEZ (1945). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico.



* Absorve em 700 nm

O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido (azul de molibdênio) é $4.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir $1 \mu\text{mol}$ de Pi por minuto.

3.2.5. Determinação da constante de inibição (K_i)

Os valores de constante de inibição foram determinados para o molibdato, fluoreto, vanadato, pervanadato e fosfato, utilizando-se o método de Dixon, que consiste da determinação da velocidade com diferentes concentrações do inibidor (molibdato, fluoreto, vanadato, pervanadato e fosfato), utilizando-se duas concentrações diferentes de pNPP que eram mantidas constantes durante o experimento.

O pervanadato foi preparado misturando-se volumes iguais de peróxido de hidrogênio 1 mM e m-vanadato 1 mM ; esta mistura foi utilizada após 20 minutos (ZHAO et alii, 1996).

3.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação da atividade das 4 isoformas foi realizada nos pHs ótimos variando-se a concentração dos substratos pNPP, PEP, PPI, e TyrP (0,05-20 mM), de acordo com o método 3.2.4b. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados pelo gráfico de duplos-recíprocos (LINEWEAVER & BURK, 1934).

3.2.7 - Efeito da temperatura

a) Hidrólise térmica dos substratos

Os substratos pNPP, Tyr-P ou PPI (10 mM) foram incubados juntamente com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 num volume final de 1 mL à temperaturas diferentes por 10 minutos; logo após a quantidade de fosfato liberado foi determinada como descrito em 3.2.4b.

b) Velocidade da reação catalisada pelas 4 isoformas em diferentes temperaturas

O experimento foi realizado como descrito em 3.2.4b, utilizando-se como substratos pNPP, Tyr-P e PPI (10 mM). O tempo de reação foi de 10 minutos e a faixa de temperatura utilizada foi de 10 a 80 °C.

c) Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m)

A determinação da atividade das 4 isoformas foi realizada variando-se a concentração dos substratos p-NPP e PPI (0,05-20 mM) de acordo com o método 3.2.4.b nas temperaturas de máxima atividade. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados pelo gráfico de duplos-recíprocos (LINEWEAVER & BURK, 1934).

d) Estabilidade térmica

Neste experimento as 4 isoformas foram pré-incubadas (na ausência do substrato) no tampão de ensaio (acetato 0,1 M, pH 5,0), em diferentes tempos, a 60, 70 e 80 °C; logo após a atividade foi determinada como descrito no método 3.2.4.a, a 37 °C. A atividade em que a enzima não foi pré-incubada foi considerada como 100%.

e) Estudos de proteção

As isoformas foram pré-incubadas em diferentes tempos em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 na presença de diferentes compostos (triton X-100 1%, fosfato 10 mM, p-nitrofenol 10 mM, vanadato 10 mM) à 70 °C; logo após a atividade foi determinada como descrito no método 3.2.1.a, a 37 °C. A atividade em que a enzima não foi pré-incubada foi considerada como 100%.

f) Determinação da energia de ativação

A energia de ativação foi determinada para as 4 isoformas utilizando-se como substrato o pNPP, através do gráfico de Arrhenius ($\log k \times 1/T$).

3.2.8. Efeito de açúcares

A atividade das frações enzimáticas foi determinada na presença de alguns açúcares de acordo com métodos 3.2.4a; a atividade na ausência de composto foi considerada 100%.

3.2.9 – Especificidade por Substratos

A atividade das isoformas sobre alguns compostos fosforilados foi determinada dosando-se o fosfato liberado no meio de reação como descrito em método 3.2.4b. Foi utilizado tampão acetato pH 5,0. A atividade sobre o pNPP foi considerada como 100%.

3.2.10 - Efeito do pH

O efeito do pH no meio de reação foi realizado em meios de incubação preparados com diferentes tampões, com valores de pH de 2,5 a 9,0. A atividade foi determinada como descrito em 3.2.4; foi feito um controle para cada pH.

3.2.11. Efeito de Diferentes Compostos

A atividade das isoformas foi determinada nos seus pHs ótimos, na presença de metais, potenciais inibidores, lectinas e outros compostos. A atividade das mesmas foi determinada de acordo com métodos 3.2.4 a e b; a atividade na ausência de composto foi considerada 100%.

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo da presente tese foi estudar as 4 isoformas de fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja quiescentes do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas e cinéticas. A caracterização físico-química envolve os estudos de pontos isoelétricos, metais e carboidratos, e a caracterização cinética compreende os estudos de temperatura, inibidores, lectinas e substratos fisiológicos.

Estes dois assuntos serão apresentados e discutidos em duas partes:

Parte I – Propriedades físico-químicas

Parte II – Propriedades cinéticas.

Parte I

Caracterização Físico-Química

- Ponto isoelétrico
- Metal Constituinte
- Fração de Carboidratos

Determinação do Ponto Isoelétrico

O ponto isoelétrico das 4 isoformas das fosfatases ácidas de sementes de soja pôde ser previamente estabelecido numa faixa de pH de acordo com o comportamento destas enzimas durante as etapas de purificação em que foram utilizadas resinas de troca iônica (SP-Sephadex e DEAE-Sephadex), como mostrado na Tabela 1:

Tabela 1

Faixa de pH onde possivelmente se encontra o pI das isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B. *As propriedades de cada isoforma de ser retida (+) ou não (-) nas cromatografias em SP-Sephadex e DEAE-Sephadex foram obtidas de dados previamente descritos (FERREIRA et alii, 1998a)*

Isoforma	SP-Sephadex (pH 5,0)	DEAE-Sephadex (pH 7,5)	Faixa de pH onde se encontra o pI
AP1	-	+	$pI \leq 5,0$
AP2	+	+	$5 < pI < 7,5$
AP3A	+	-	$pI \geq 7,5$
AP3B	+	+	$5 < pI < 7,5$

A última coluna (dos valores de pI) foi elaborada, baseando-se no fato das isoformas serem ou não retidas nos valores de pH 5,0 na coluna de SP-Sephadex (catiônica), e de pH 7,5 na coluna de DEAE-Sephadex (aniônica).

Na eletrofocalização obtivemos pontos isoelétricos de 4,9, 5,7, 9,8 e 7,4 para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente (Figuras 1 a 4). Os valores dos pontos isoelétricos foram compatíveis ao comportamento observado nos perfis de eluição das isoformas nas cromatografias de troca iônica (Tabela 1).

Na determinação dos pontos isoelétricos nos géis foram consideradas as bandas de maior intensidade. As outras bandas que aparecem nos géis são devidas às heterogeneidades provenientes da porção de carboidratos (FERREIRA et alii, 1998a).

O valor do pI da isoforma AP3A foi o maior encontrado na literatura até o momento. A Tabela 2, mostra os valores de pI de algumas fosfatases ácidas de plantas.

O valor do ponto isoelétrico de cada isoforma foi uma importante diferença entre estas isoformas. Esta característica foi de grande auxílio para a utilização de resinas de troca iônica durante a purificação das isoformas presentes nas sementes de soja quiescentes.

Tabela 2**Valores de pI de algumas fosfatases ácidas de plantas.**

Fonte	PI	Referência
Cotilédone de soja	6,7	ULLAH & GIBSON (1988)
Células de mostarda em cultura	4,5	DUFF et alii (1989)
Cloroplasto de cana-de-açúcar	6,5	RANDALL & TOLBERT (1971)
Hipocotilédone de soja	4,7	DEWALD et alii (1993)

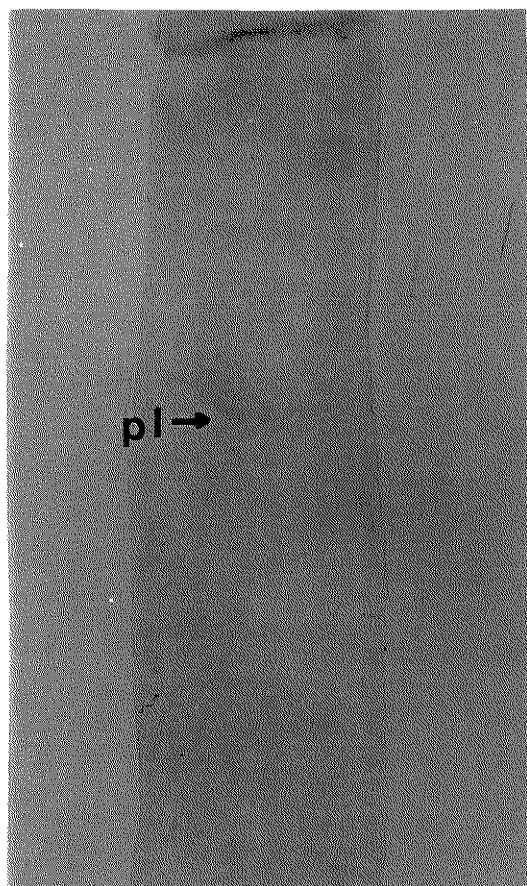


Figura 1 - Isoeletrofocalização da isoforma AP1

As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.1. Foram aplicados 25 µg de proteína e utilizados anfólitos de pH 5,0 a 3,5.

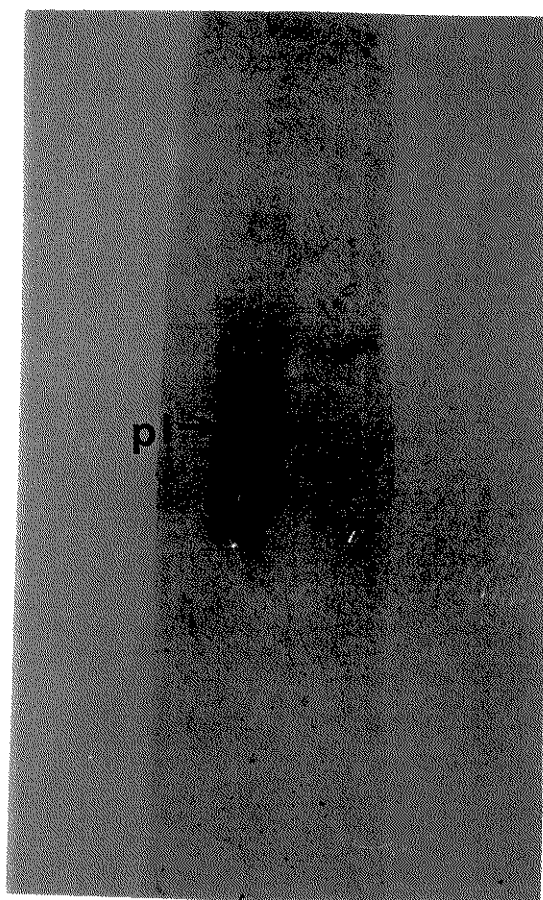


Figura 2 – Isoeletrofocalização da isoforma AP2

As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.1. Foram aplicados 25 µg de proteína e utilizados anfólitos de pH 10,0 a 3,5.

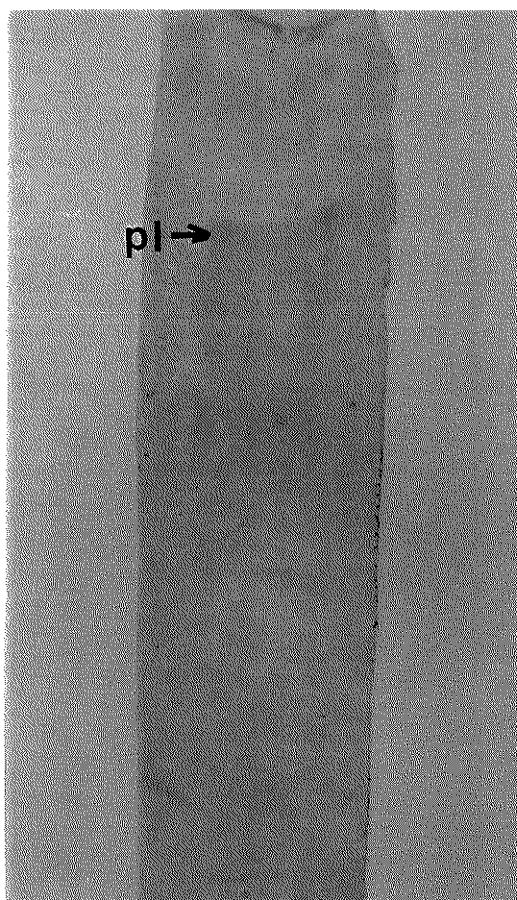


Figura 3 - Isoeletrofocalização da isoforma AP3A

As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.1. Foram aplicados 25 μ g de proteína e utilizados anfólitos de pH 10,0 a 3,5.

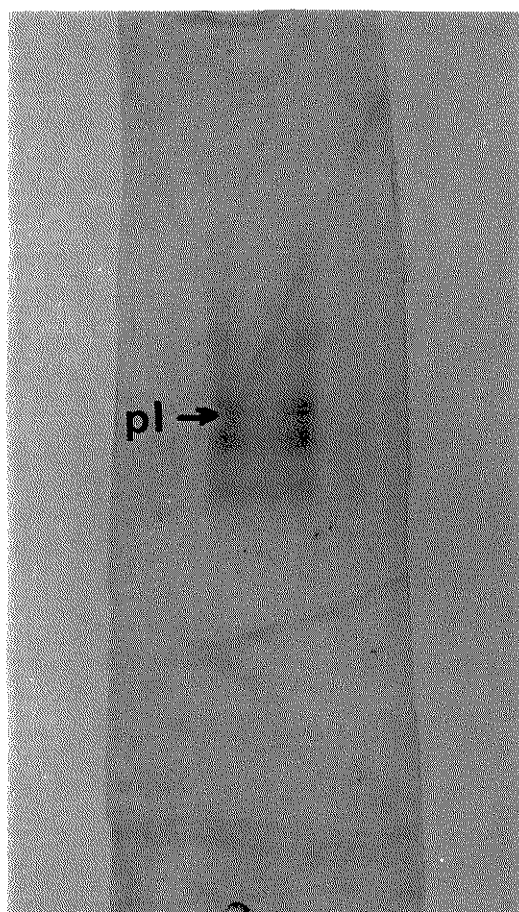


Figura 4 - Isoeletrofocalização da isoforma AP3B

As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.1. Foram aplicados 25 μ g de proteína e utilizados anfólitos de pH 10,0 a 3,5.

Análise qualitativa de metais

A varredura do espectro de absorção das isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, mostrou que apenas as isoformas AP1 e AP3A apresentaram um pico de absorção em 401 nm, típico de proteína que possui ferro em sua estrutura (Figura 5). A presença de ferro na estrutura das isoformas AP1 e AP3A pôde ser confirmada também pela inibição da atividade (cerca de 40%) destas duas isoformas quando 5 mM de o-fenantrolina foi adicionado ao meio de reação (resultados não mostrados).

Muitas fosfatases ácidas de plantas apresentam metal em sua estrutura. Estas fosfatases, denominadas de fosfatases ácidas púrpuras, são facilmente distinguidas de outras fosfatases ácidas pela cor púrpura ou violeta avermelhada quando em solução, a qual é devida à presença de magnésio, ferro ou zinco nas suas estruturas (BECK et alii 1986; HEFLER & AVERILL, 1987; VINCENT et alii 1992). A presença destes metais pode favorecer a ligação do substrato com a enzima, participando assim, diretamente da reação, ou ajudar na manutenção da estrutura proteica e com isto manter a conformação adequada para a catálise enzimática (DUFF et alii, 1994).

Determinação de Carboidrato Total

Comumente as fosfatases ácidas de plantas são glicoproteínas (DUFF et alii, 1994). Como mostrado anteriormente (FERREIRA et alii, 1998b) as 4 isoformas são glicoproteínas. As isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B apresentaram 30, 28, 18 e 10% de carboidratos em suas estruturas (Tabela 3).

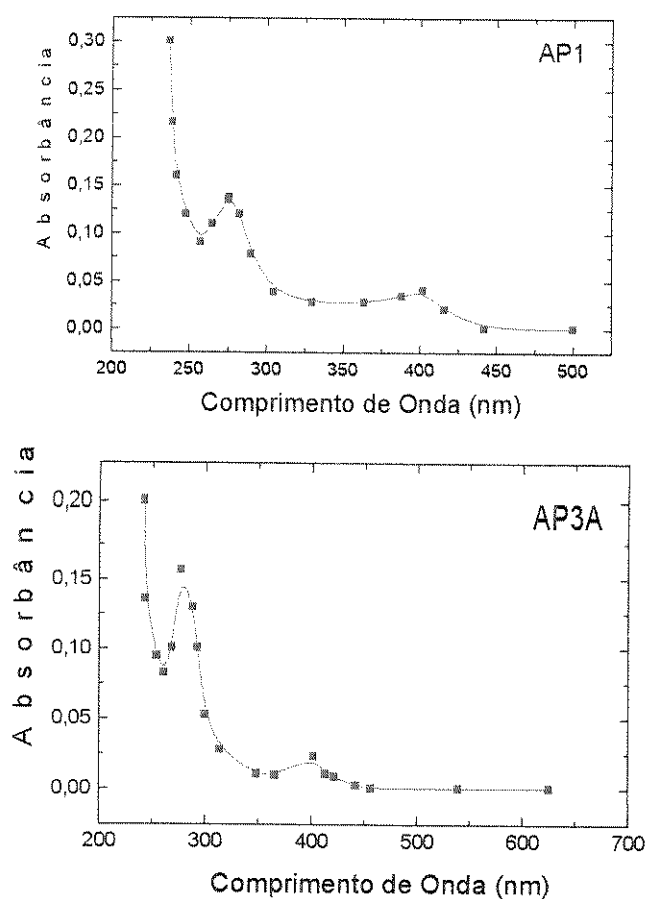


Figura 5 – Espectro de absorção das isoformas AP1 e AP3A

O espectro de absorção foi observado nos comprimentos de onda de 200 a 700 nm; as isoformas AP1 e AP3A foram eluídas das colunas do último passo de purificação, DEAE-Sephadex e SP-Sephadex, respectivamente (FERREIRA et alii, 1998 a).

Tabela 3**Determinação de carboidrato total das isoformas de fosfatases ácidas**

O teor de carboidrato total foi determinado de acordo com o método de Dishe (Métodos 3.2.3).

Isoforma	Carboidrato total (%)
AP1	30
AP2	28
AP3A	18
AP3B	10

A presença de carboidratos nas enzimas, principalmente de plantas, por um lado, facilita sua purificação, uma vez que são retidas em resinas de concanavalina A-Sepharose (FERREIRA et alii, 1998 a), porém, por outro, prejudica o perfil de eletroforese, uma vez que os carboidratos são responsáveis pela heterogeneidade que aparece nos géis (MORRIS et alii, 1989).

Parte II

Caracterização Cinética

- Temperatura
- Inibidores
- Lectinas
- Substratos Fisiológicos

Temperatura

A Figura 6 mostra o efeito da temperatura na hidrólise térmica dos substratos pNPP, Tyr-P e PPi. A hidrólise dos 3 substratos não foi significante até 80 °C, no entanto, à 90 °C foi cerca de 7 vezes maior do que a ocorrida à 80 °C (menos de 0,1 μ mol de fosfato). Os substratos pNPP, Tyr-P e PPi por serem estáveis em altas temperaturas (até 80°C) foram escolhidos para o estudo do efeito da temperatura na atividade das fosfatases ácidas.

A Figura 7 mostra que as 4 isoformas apresentaram alta atividade catalítica à 80 °C quando o pNPP foi utilizado como substrato; à 90°C a atividade destas enzimas ainda foi maior, porém nesta temperatura a hidrólise térmica do pNPP foi significativa, tanto que a absorbância do tubo controle era alta o que tornava impossível zerar o espectrofotômetro. Este resultado foi totalmente diferente do esperado, uma vez que tem sido relatado na literatura que as fosfatases de plantas em geral apresentam alta atividade em torno de 50-60 °C, utilizando-se como substrato o pNPP.

Para os outros substratos, PPi e TyrP, atividade máxima observada foi em torno de 50-60°C (FERREIRA et alii, 1998a).

O efeito da concentração do substrato foi verificado para o pNPP e PPi. A determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foi realizada variando-se a concentração dos substratos de 0,05 até 20 mM à 80 °C quando o substrato utilizado foi pNPP, e à 60 °C quando se utilizou o PPi; para a isoforma AP3A esta temperatura foi de 50 °C.

Para o pNPP não foi possível determinar os parâmetros cinéticos à 80 °C pois até 20 mM não se atingiu o platô. Os valores dos parâmetros cinéticos quando se utilizou o PPi como substrato estão mostrados na Tabela 4. Os valores de K_m diminuem com o aumento da temperatura para as isoformas AP1 e AP2. Pode-se notar também que a constante de especificidade ($V_{m\acute{a}x}/K_m$) das 4 isoformas pelo substrato aumenta com o aumento da temperatura. Entre as 4 isoformas, AP1 e AP3A apresentam os maiores valores de constante de especificidade, tanto a 37 °C quanto a 60 °C, sugerindo uma catálise mais eficiente do PPi.

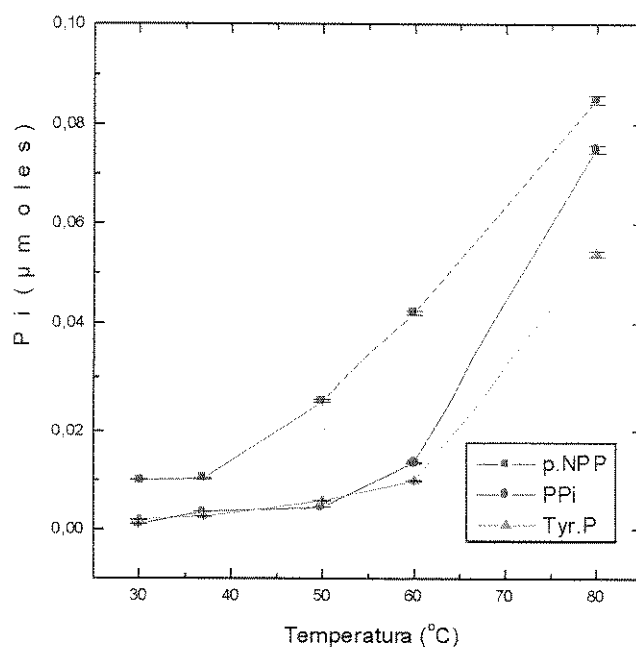


Figura 6 - Efeito da temperatura na hidrólise dos substratos p-NPP, Tyr-P e PPi.

Os substratos pNPP, Tyr-P e PPi (10 mM) foram incubados juntamente com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 num volume final de 1 mL à temperaturas diferentes por 10 minutos. Logo após, a quantidade de fosfato liberado foi determinado como descrito em 3.2.4b. A concentração do fosfato foi determinada utilizando-se uma curva padrão. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

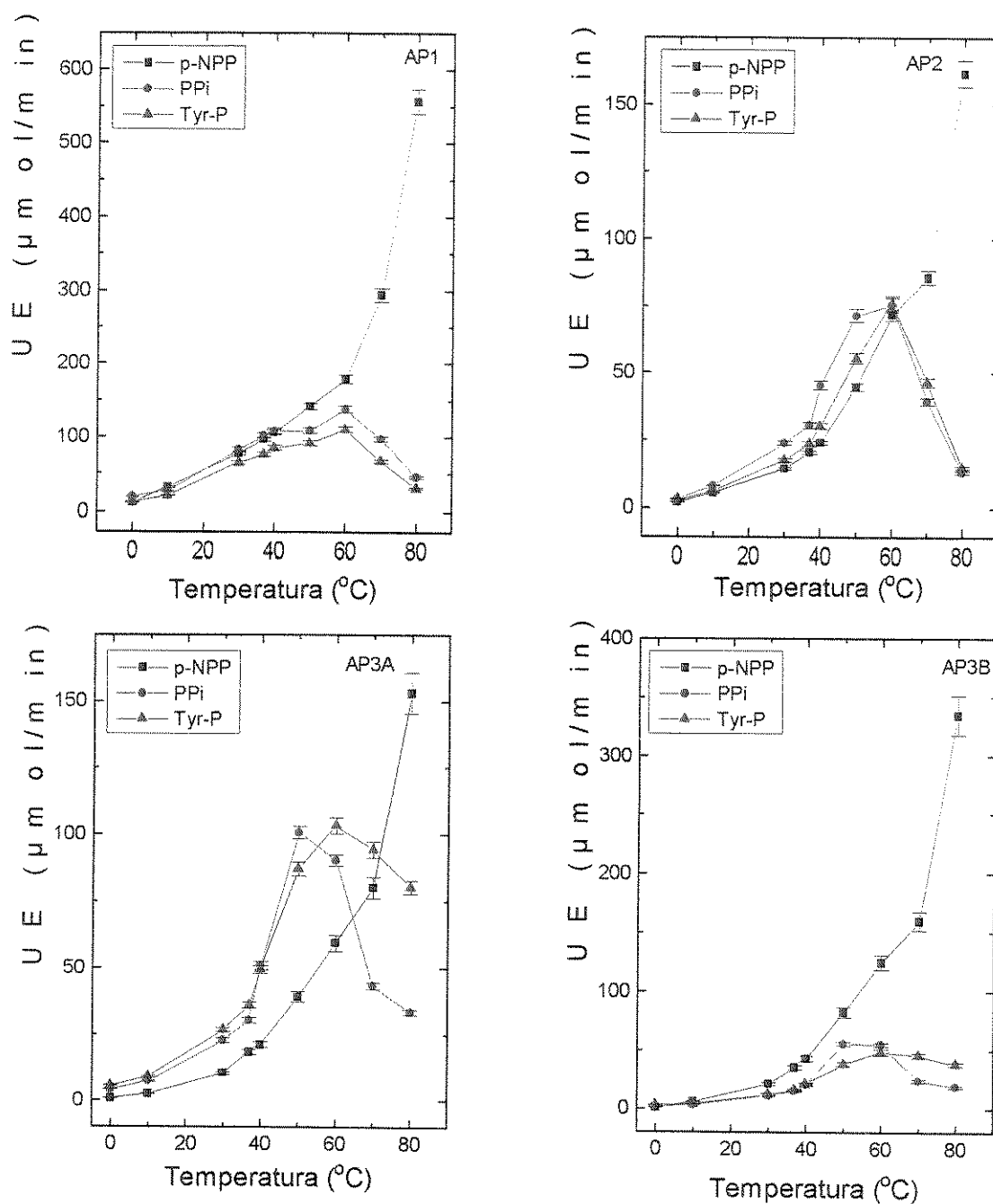


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade das fosfatases ácidas

O experimento foi realizado como descrito em 3.2.4b, utilizando-se como substratos pNPP, Tyr-P e PPi (10 mM). O tempo de reação foi de 10 minutos. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Tabela 4**Parâmetros cinéticos para as fosfatases ácidas utilizando PPi como substrato**

As quatro isoformas foram incubadas em presença de PPi como substrato, a 37 °C e 60 °C, com exceção da isoforma AP3A cuja incubação foi de 50 °C. A atividade enzimática foi determinada como descrito em métodos 3.2.4.b. Os parâmetros foram calculados do gráfico dos duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK.

Isoforma	Vmáx (μmol/min)		Km (mM)		Vmáx/Km	
	37 °C	60 °C	37 °C	60 °C	37 °C	60 °C
AP1	73	107	0,51	0,096	234	1.112
AP2	20	89	1,33	0,397	16	225
AP3A	37	125	0,16	0,118	232	1.060
AP3B	16	62	0,17	0,119	92	522

O estudo da estabilidade térmica das fosfatases ácidas (Figura 8) foi realizado pré-incubando-se as isoformas em diferentes temperaturas. Em diferentes tempos, alíquotas eram retiradas e deixadas em banho de gelo, sendo logo após, a atividade residual determinada à 37 °C. Não houve diferença quando a atividade era determinada após as isoformas serem deixadas ou não no gelo, o que mostra que não houve renaturação.

Os resultados mostram que as fosfatases apresentam alta estabilidade à 60 °C uma vez que as mesmas permaneceram com cerca de 80 % da atividade após 1h de pré-incubação. À 70 °C, as isoformas AP3A e AP3B ainda apresentaram cerca de 30% da atividade após 1h. No entanto, à 80 °C, após 5 minutos de pré-incubação todas as isoformas perderam totalmente a atividade.

O comportamento das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes frente ao efeito da temperatura quando as mesmas foram pré incubadas, mostra que estas fosfatases são mais estáveis do que outras fosfatases de plantas relatadas na literatura até o momento. NINOMIYA et alii (1977) purificaram de células de tabaco em cultura uma fosfatase ácida que nos estudos de inativação à 55°C permaneceu com cerca de 10% da atividade após 30 minutos. Duas frações contendo atividade fosfatásica foram purificadas também de células de tabaco cultivadas na ausência de fosfato por UEKI & SATO (1977) os quais mostraram que a fração denominada S-1 foi razoavelmente estável e a fração S-2 foi inativada cerca de 90% quando pré-incubadas à 55°C. A fosfatase ácida de raízes de cevada perdeu 50% da atividade após 5 minutos de pré-incubação a 50°C (PANARA et alii, 1990). GELLATLY et alii (1994) relataram que uma fosfatase ácida de tubérculos de batata apresentou 100% da atividade após 4 minutos de pré-incubação a 65°C.

No estudo de proteção foram utilizados como possíveis protetores o p-NP e Pi (produtos da hidrólise do pNPP), triton X-100 (composto que teve um efeito ativador da isoforma AP1 - FERREIRA, 1995) e vanadato (análogo do Pi) - (Figura 9).

Dentre os compostos testados, o melhor efeito protetor foi observado quando as isoformas eram pré-incubadas com p-NP e Pi juntos. Para a isoforma AP1 este efeito foi de 100%, já para as isoformas AP3A e AP3B estes dois compostos protegeram cerca de 90%. O efeito do p-NP e Pi juntos sobre a isoforma AP2 foi

menor quando comparado com as outras isoformas, pois protegeram cerca de 60%. No entanto, o efeito ainda foi maior que o observado quando esta fração era pré-incubada com Pi, triton X-100, vanadato e pNP, separadamente.

Quando as isoformas foram pré-incubadas com Pi e pNP separadamente, o melhor efeito foi observado para a isoforma AP3B, pois a mesma permaneceu com cerca de 80% da atividade após 30 minutos. Para as isoformas AP1 e AP3A, estes compostos tiveram um efeito protetor de aproximadamente 50%; considerando que a fração AP3A quando pré-incubada na ausência de composto apresentou 40% da atividade, este efeito não foi muito significativo. Já para a isoforma AP2, estes compostos não tiveram efeito protetor apreciável em 30 minutos de pré-incubação. O vanadato somente teve efeito protetor para as isoformas AP1 e AP2. O triton X-100 somente teve efeito significativo na proteção da isoforma AP1. Para a isoforma AP3B este composto apresentou cerca de 20% de proteção, nenhuma proteção para a fração AP2 e mostrou até um efeito sinérgico para inativação da fração AP3A. YAMAGATA et alii (1980) mostraram que o triton X-100 apresentava um importante papel na estabilidade da fosfatase ácida de partículas aleurônica de grãos de arroz, uma vez que na presença do mesmo, esta enzima não perdia nenhuma atividade durante 24h de pré-incubação a 20°C.

Todos os compostos testados quando utilizados em concentrações maiores não tiveram aumento no seu efeito protetor.

A energia de ativação para a catálise da hidrólise do p-NPP foi determinada utilizando-se o gráfico de Arrhenius. Os valores encontrados foram de 35,13, 42,15, 54,56 e 50,38 kJ mol⁻¹ para AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5

Energia de ativação da hidrólise de pNPP pelas fosfatases ácidas de sementes de soja. *Os valores das energias de ativação para as quatro isoformas enzimáticas foram obtidos das inclinações das retas dos graficos de Arrhenius ($\log k \times 1/T$) (resultados não mostrados).*

Isoforma	Energia de Ativação (kJ mol ⁻¹)
AP1	35,13
AP2	42,15
AP3A	54,56
AP3B	50,38

Os valores de energia de ativação encontrados para as fosfatases ácidas de sementes de soja são maiores que a observada para a fosfatase ácida de células de tabaco em cultura (10,4 kJ mol⁻¹, KANEKO et alii, 1990), porém similares a relatada para a fosfatase ácida de baixa massa molecular purificada de rim bovino (45,44 kJ mol⁻¹, GRANJEIRO et alii, 1997).

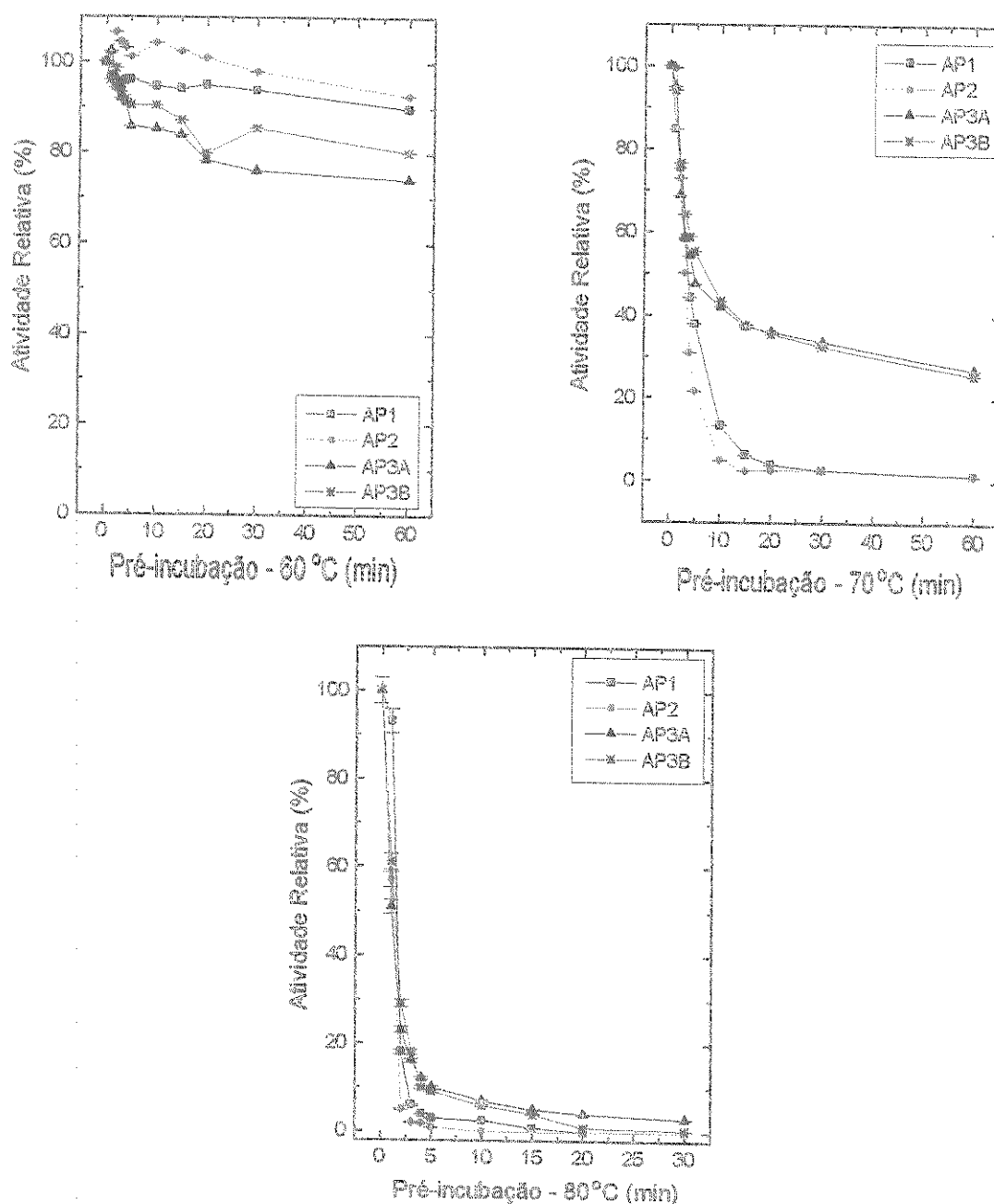


Figura 3 - Estabilidade Térmica das fosfatases ácidas.

As isoformas foram pré-incubadas no tampão de ensaio (acetato 0,1 M, pH 5,0) em diferentes tempos, à 60, 70 e 80 °C; logo após a atividade foi determinada como descrito no método 3.2.4.a, a 37 °C. A atividade em que a enzima não foi pré-incubada foi considerada como 100%. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

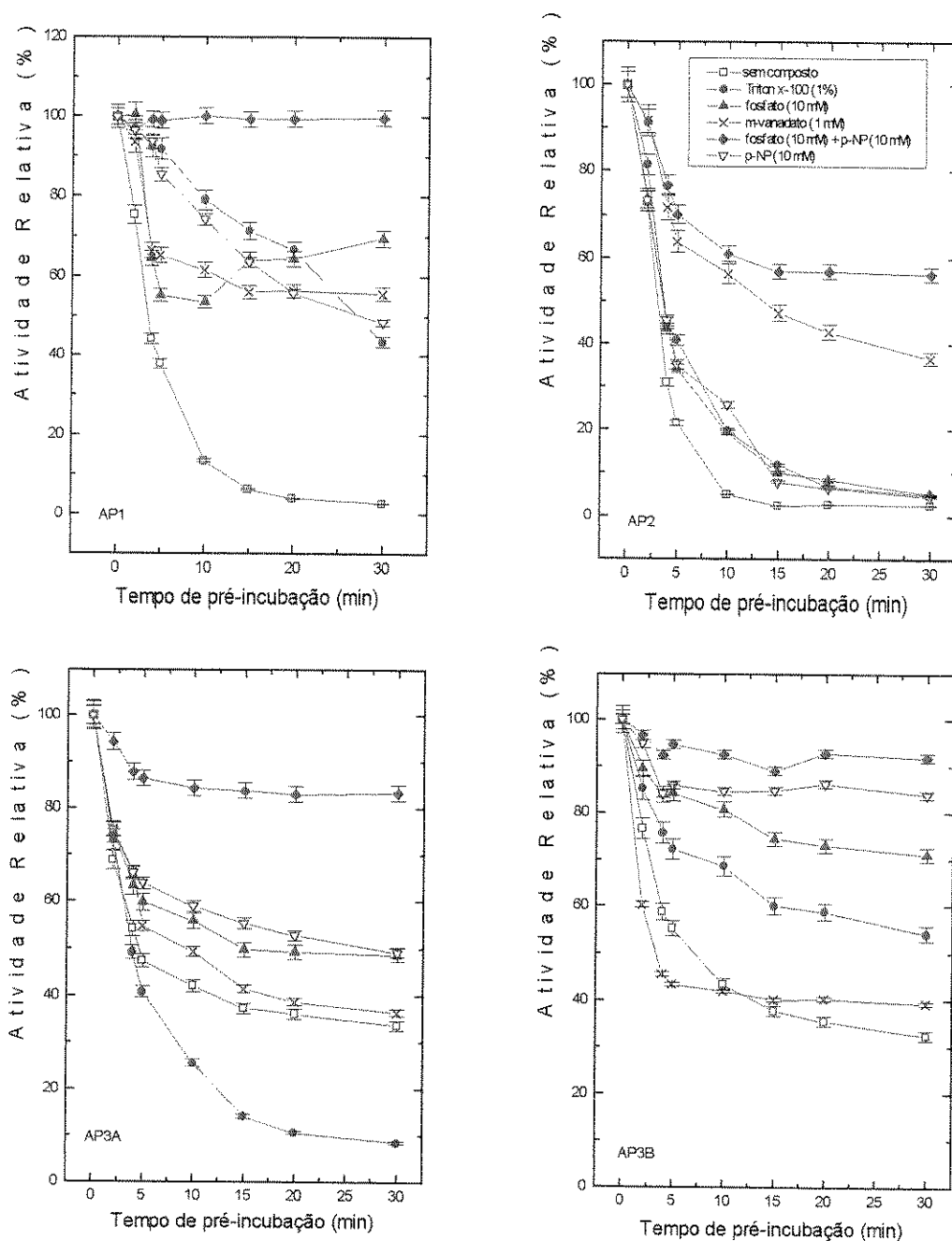


Figura 9 - Estudo da proteção da inativação térmica das fosfatases ácidas

As isoformas foram pré-incubadas em diferentes tempos em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 na presença de diferentes compostos (triton X-100, fosfato, p-nitrofenol, vanadato) à 70 °C; logo após a atividade foi determinada como descrito no método 3.2.4.a, a 37 °C. A atividade em que a enzima não foi pré-incubada foi considerada como 100%. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Inibidores

Quanto ao estudo de inibidores de fosfatases ácidas de sementes de soja, as 4 isoformas foram inibidas pelo o- e m-Vanadato, molibdato, fosfato e fluoreto (Tabela 6). O tartarato (5mM) não apresentou nenhum efeito na atividade enzimática; esta insensibilidade ao tartarato é comum em fosfatases ácidas de plantas (ROSSI et alii, 1981, PASQUALINI et alii, 1992 FUJISAWA et alii, 1993).

O p-cloromercuribenzoato (pCMB) somente inibiu as 4 isoformas em uma concentração de 1 mM ao contrário das fosfatases ácidas de baixa massa molecular de animal que são completamente inibidas com uma concentração de 100 μ M (BALDIJÃO, et alii, 1975; BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1976; DAVIS & VAN ETTEN, 1992; GRANJEIRO, 1994). A inibição das 4 isoformas pelo pCMB se deu pelo fato de que este reagente se liga especificamente a grupos -SH livres. No entanto, como a concentração para esta inibição foi na faixa de mM, mostra que estes grupos possivelmente não estejam envolvidos diretamente na catálise enzimática, mas que são importantes mantenedores da conformação destas isoformas para que a catálise seja efetiva.

A não inibição das enzimas pelo piridoxal 5-P indica que provavelmente as mesmas não apresentam resíduo de lisina essencial para a catálise, pois este composto forma base de Schiff com esses resíduos impedindo a catálise enzimática.

A seguir, foi feito um estudo mais detalhado das 4 isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja em presença de cada um dos inibidores.

Tabela 6**Efeito de potenciais inibidores na atividade das fosfatases ácidas**

A atividade enzimática sobre o pNPP (5mM) foi considerada 100% na ausência do composto e determinada como descrito em método 3.2.4a. Os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Inibidor	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
o-Vanadato 100 μ M	25 ($\pm$ 2)	47 ($\pm$ 2)	59 ($\pm$ 3)	63 ($\pm$ 1)
m-Vanadato 100 μ M	28 ($\pm$ 1)	43 ($\pm$ 2)	57 ($\pm$ 2)	62 ($\pm$ 2)
pCMB 100 μ M	100 ($\pm$ 4)	104 ($\pm$ 3)	106 ($\pm$ 2)	102 ($\pm$ 4)
pCMB 1 mM	31 ($\pm$ 2)	77 ($\pm$ 2)	84 ($\pm$ 4)	66 ($\pm$ 3)
Molibdato 100 μ M	2 ($\pm$ 1)	5 ($\pm$ 2)	6 ($\pm$ 1)	13 ($\pm$ 3)
Fosfato 1 mM	73 ($\pm$ 4)	84 ($\pm$ 3)	86 ($\pm$ 2)	88 ($\pm$ 4)
Fosfato 10 mM	18 ($\pm$ 2)	26 ($\pm$ 2)	32 ($\pm$ 2)	41 ($\pm$ 3)
Tartarato 5 mM	98 ($\pm$ 3)	101 ($\pm$ 4)	102 ($\pm$ 5)	101 ($\pm$ 4)
Piridoxal-5P 100 μ M	102 ($\pm$ 4)	97 ($\pm$ 5)	94 ($\pm$ 3)	96 ($\pm$ 2)
Fluoreto 1 mM	72 ($\pm$ 3)	37 ($\pm$ 1)	38 ($\pm$ 5)	52 ($\pm$ 4)
Fluoreto 5 mM	32 ($\pm$ 2)	15 ($\pm$ 2)	14 ($\pm$ 4)	22 ($\pm$ 3)

Estudo de inibição pelo fosfato inorgânico

As 4 isoformas (AP1, AP2, AP3A e AP3B) apresentaram para o Pi, inibição do tipo competitiva (Figura 10). Através do método do Dixon obteve-se os seguintes valores de K_i : 250, 800, 250 e 2.400 μM , para cada isoforma, respectivamente.

As isoformas AP1 e AP3A apresentaram valores de K_i cerca de 10 vezes menores do que a isoforma AP3B, demonstrando que a afinidade do fosfato por estas isoformas é maior. Resultados semelhantes aos encontrados para as isoformas AP1, AP2 e AP3A foram observados para a fosfatase ácida de folhas de tabaco, K_i - 500 μM (SHAW 1966), das sementes de soja em germinação, K_i - 280 μM (ULLAH & GIBSON, 1988) e para as isoformas AP1, AP2 e AP3 purificadas de sementes de feijão, K_i - 500, 250 e 120 μM , respectivamente (BISWAS & CUNDIFF, 1991). A fosfatase ácida de membranas tilacóides de sorgo apesar de apresentar uma K_i de 263 μM , a inibição pelo fosfato foi do tipo não competitiva (RENGASAMY et alii, 1981).

A isoforma AP3B apresentou elevado valor de K_i , o qual foi semelhante aos encontrados para algumas poucas fosfatases ácidas; K_i de 2.300 e 7.770 μM para as enzimas de grãos de arroz e tubérculos de batata, respectivamente (YAMAGATA et alii, 1980 e SUGIURA et alii, 1981).

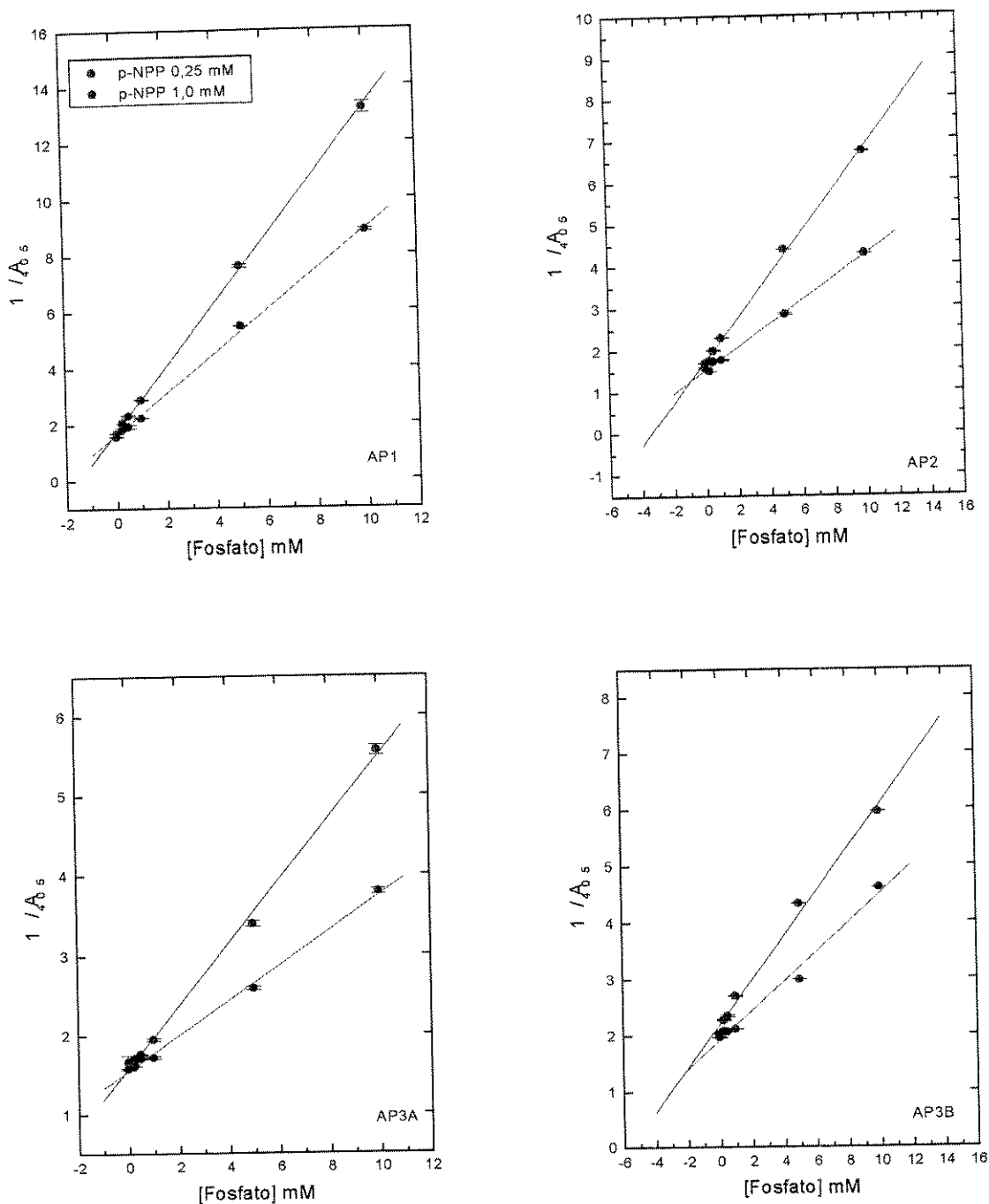


Figura 10 - Determinação da constante de inibição por fosfato para as 4 isoformas de fosfatases ácidas.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a e a K_i determinada pelo método de DIXON (método 3.2.5) utilizando-se concentrações de pNPP de 0,25 e 1 mM e de P_i 0-10 mM. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Estudo de inibição pelo fluoreto

O fluoreto inibiu as 4 isoformas de modo competitivo (Figura 11). Este resultado foi diferente dos relatados na literatura que mostraram inibição do tipo não competitiva para este composto. Os valores de K_i - 1.714, 500, 250 e 750 μM para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente, foram semelhantes aos obtidos para fosfatases ácidas de sementes de feijão (K_i - 470 e 670 μM ; DEKUNDU & BANERJEE, 1990) e sementes de amendoim (K_i - 320 μM ; BASHA, 1984), apesar da inibição ter sido do tipo não competitivo. BISWAS & CUNDIFF (1990) purificaram das sementes de feijão 4 frações contendo atividade fosfatásica que apresentaram valores de K_i significativamente mais altos, 9, 10, 8,5 e 11 mM.

Diferentemente do observado para o fosfato inorgânico a isoforma AP1 é menos susceptível à inibição pelo fluoreto, corroborando os dados da tabela 6.

Estudo de inibição pelo molibdato

A inibição das 4 isoformas pelo molibdato foi do tipo competitivo (Figura 12). Os valores de K_i foram 0,05 μM para as isoformas AP1 e AP3B; 0,025 e 0,032 μM para as isoformas AP2 e AP3A, respectivamente. Uma fosfatase ácida de folhas de tabaco também apresentou valor de K_i de 0,027 μM (SHAW, 1966) ao contrário da fosfatase ácida de endospermas de milho (MIERNYK et alii, 1992), com uma K_i para o molibdato de 1.200 μM .

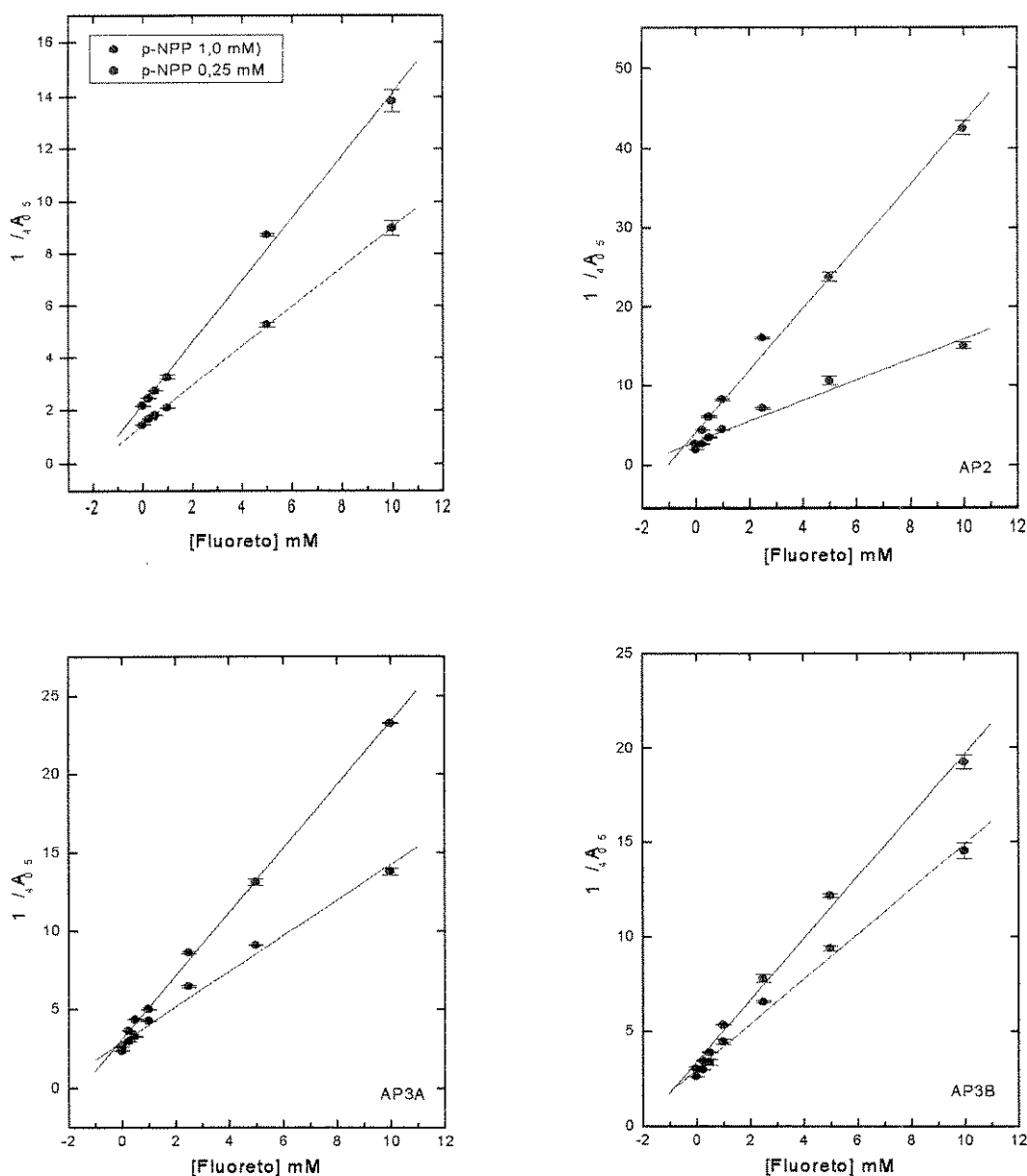


Figura 11 - Determinação da constante de inibição por fluoreto para as 4 ra as 4 isoformas de fosfatases ácidas.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a e a K_i determinada pelo método de DIXON (método 3.2.5) utilizando concentrações de pNPP de 0,25 e 1 mM e de fluoreto 0-10 mM. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

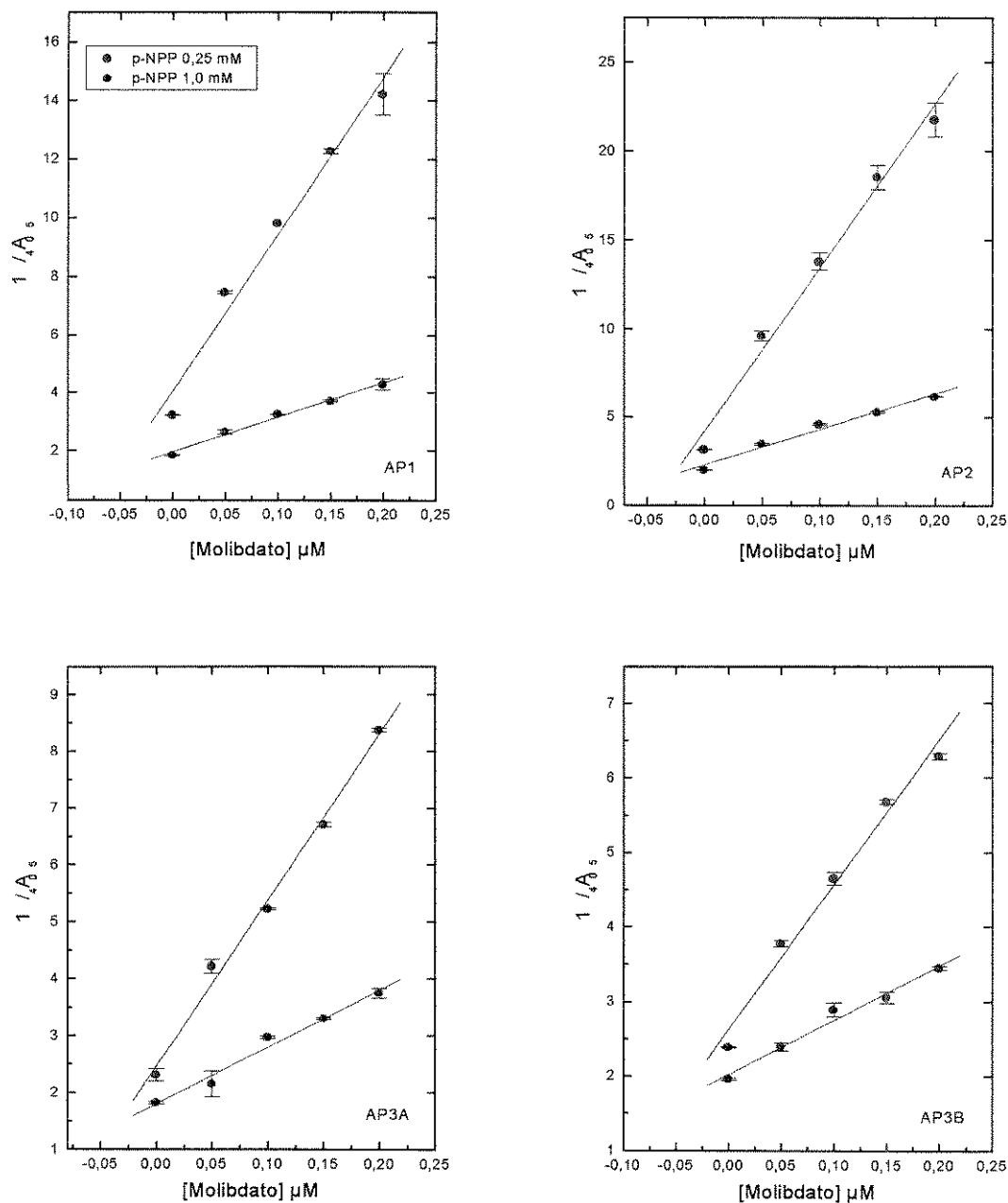


Figura 12 - Determinação da constante de inibição por molibdato para as 4 isoformas de fosfatases ácidas.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a e a K_i determinada pelo método de DIXON (método 3.2.5) utilizando concentrações de pNPP de 0,25 e 1 mM e de molibdato 0-100 μM . O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Estudo de inibição pelo Vanadato

O o-vanadato também inibiu as 4 isoformas de modo competitivo (Figura 13). Os valores de K_i para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B foram de 12,8, 10,0, 24,3 e 36,9 μM , respectivamente. De acordo com estes valores, pode-se dizer que a interação do vanadato com as 4 isoformas de fosfatase ácida se dá de forma e afinidade semelhantes.

O vanadato é reconhecidamente um inibidor de fosfatases envolvidas no processo de proliferação celular, em especial as fosfotirosil-proteínas fosfatases (LAU et alii, 1989). Os valores de K_i obtidos foram semelhantes aos encontrados para uma fosfatase ácida com atividade fosfotirosil-proteína fosfatásica purificada de coração bovino, K_i de 29 μM (ZHANG & VAN ETEN, 1990).

Estudo de inibição pelo pervanadato

A fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas representa um papel crucial na transdução de sinal. Esta fosforilação é controlada pela ação coordenada das proteínas tirosina quinases e proteínas tirosina fosfatases. Dentre os vários inibidores de proteínas fosfatases, vanadato e pervanadato têm sido amplamente utilizados nos estudos de inibição destas enzimas (HUYER et alii, 1997).

Como será observado adiante, as 4 isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja (AP1, AP2, AP3A e AP3B) hidrolizaram de forma significativa tirosina fosfato, o que sugere que as mesmas também poderiam atuar sobre proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. Deste modo, estudamos o efeito do pervanadato na atividade destas enzimas.

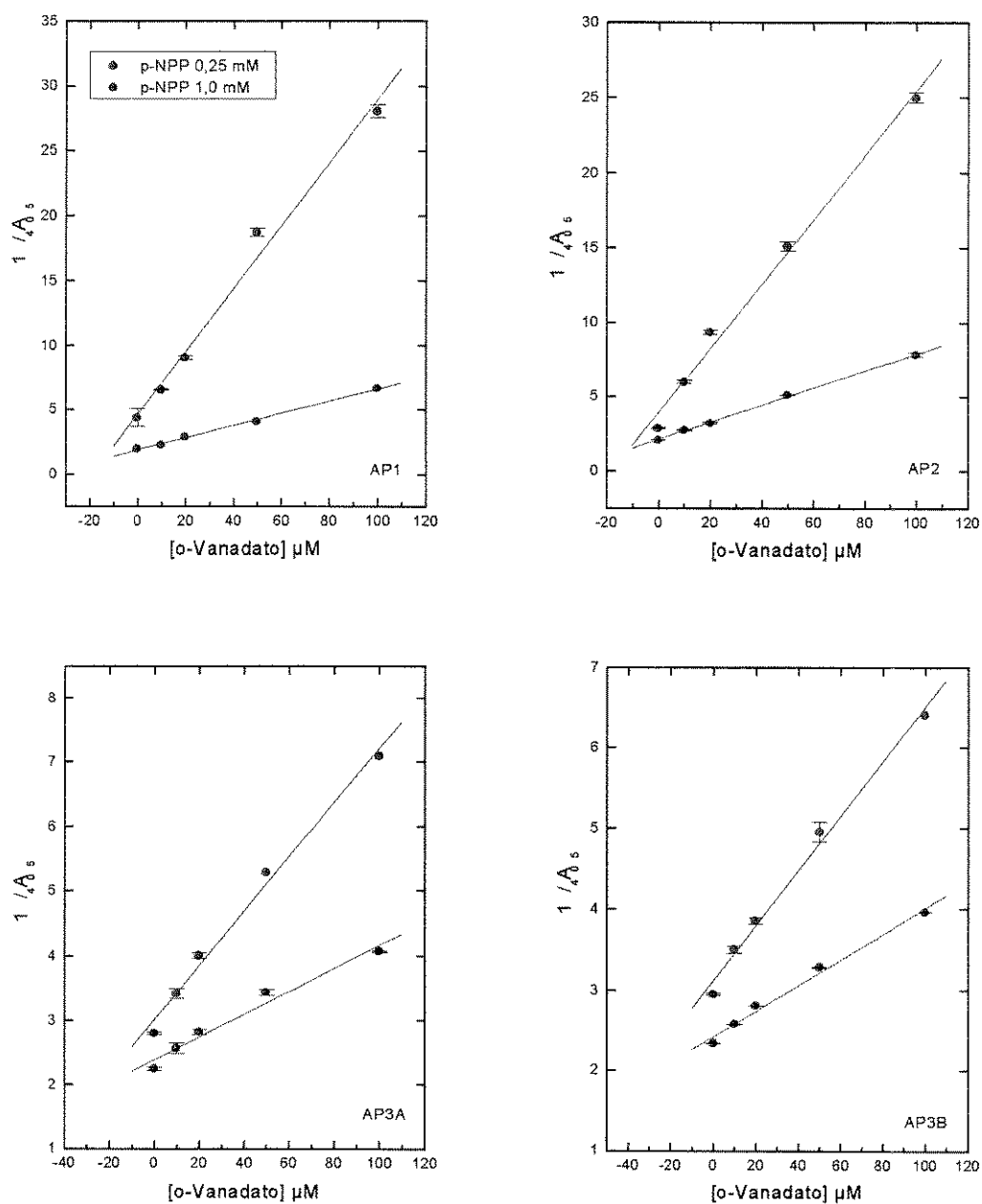


Figura 13 - Determinação da constante de inibição por o-vanadato para as 4 isoformas de fosfatases ácidas.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a e a K_i determinada pelo método de DIXON (método 3.2.5) utilizando concentrações de pNPP de 0,25 e 1 mM e de o-Vanadato 0-100 μM . O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Como o pervanadato foi preparado misturando-se volumes iguais de vanadato e peróxido de hidrogênio, estudamos o efeito do peróxido na atividade das 4 isoformas (Figura 14). As isoformas AP1 e AP3B, foram inibidas em torno de 10% na concentração de 10 mM de peróxido, as isoformas AP3A e AP2, foram inibidas 20 e 40% respectivamente. Este resultado era esperado, uma vez que o peróxido de hidrogênio atua sobre grupos -SH, e estas 4 isoformas não dependem destes grupos, pois são insensíveis ao pCMB (100 μ M), composto que reage especificamente com grupos -SH livres.

A inibição das 4 isoformas pelo pervanadato é do tipo competitiva (Figura 15). Os valores de K_i para AP1, AP2, AP3A e AP3B foram de 8, 14, 75 e 11 μ M, respectivamente. Os valores de K_i obtidos para as isoformas AP1 e AP2, foram semelhantes aos obtidos para o vanadato, já para a AP3A o pervanadato foi cerca de 3 vezes menos potente, e para a AP3B, 3 vezes mais potente. A constante de inibição foi significativamente maior que os valores encontrados para fosfatases ácidas de mamífero, que normalmente está em torno de 0,3-0,7 μ M (HUYER et alii, 1997).

HUYTER et alii (1997) propuseram que a inibição de proteínas fosfatases pelo pervanadato era devida à oxidação de resíduos de cisteína essenciais para a catálise; esta oxidação poderia gerar pontes dissulfeto (-S-S-), ácido sulfênico (-SOH), ácido sulfinico (-SO₂H) e ácido sulfônico (-SO₃H). Isto pode explicar a ausência de uma inibição significativa das fosfatases ácidas das sementes de soja

pelo pervanadato, pois como foi mencionado anteriormente, estas fosfatases não são significativamente afetadas por compostos que reagem com grupo -SH. No entanto a inibição do tipo competitiva por este composto, mostra que o mesmo pode ter algum tipo de interação no sítio ativo das isoformas. Ou ainda, se considerarmos que os valores de K_i não são significativamente diferentes dos obtidos para o o-vanadato, este composto seria o principal responsável pela inibição do pervanadato.

A Tabela 7 mostra um resumo dos estudos das 4 isoformas das fosfatases ácidas de sementes de soja em presença dos vários compostos utilizados como inibidores.

Tabela 7

Estudo de inibição das 4 isoformas contendo atividade fosfatásica de sementes de soja quiescentes

Inibidor	Isoforma - K_i (μM)				Tipo de Inibição
	AP1	AP2	AP3A	AP3B	
Fosfato	250	800	250	2.400	Competitiva
Fluoreto	1.714	500	250	750	Competitiva
Molibdato	0,05	0,025	0,032	0,05	Competitiva
o-Vanadato	12,8	10	24,3	36,9	Competitiva
Pervanadato	8,0	14	75	11,4	Competitiva

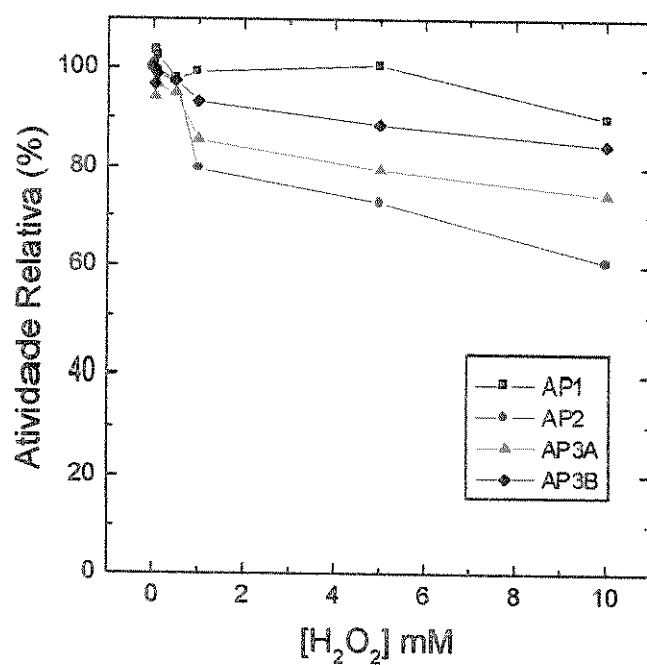


Figura 14 - Efeito do peróxido de hidrogênio na atividade das 4 isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja.

A concentração de peróxido utilizada foi de 0-10 mM e a atividade determinada de acordo com métodos 3.2.4a.

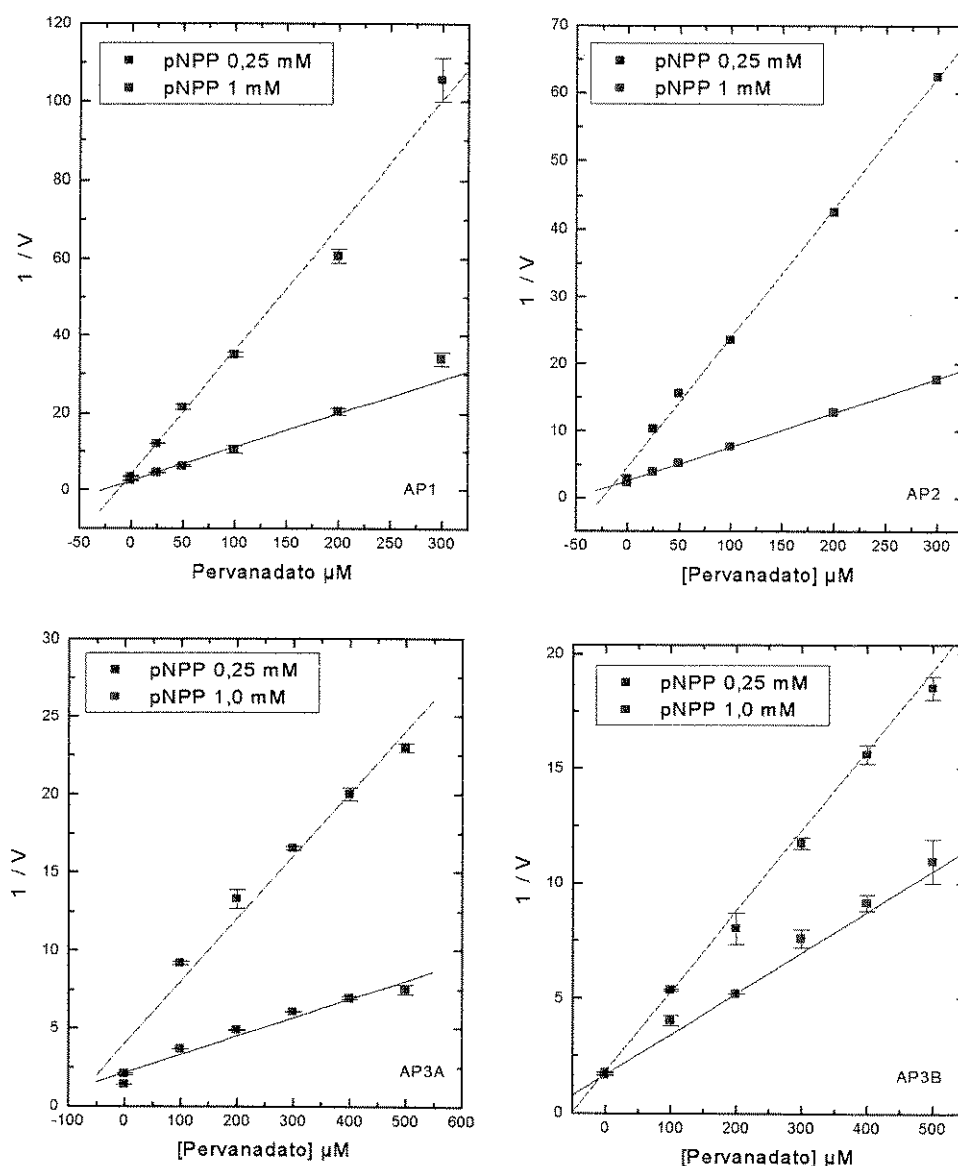


Figura 15 - Determinação das constantes de inibição pelo pervanadato para as 4 isoformas de fosfatases ácidas.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a e a K_i determinada pelo método de DIXON (método 3.2.5) utilizando concentrações de pNPP de 0,25 e 1 mM e de Pervanadato 0-300 μM para as isoformas AP1 e AP2 e de 0-500 μM para as isoformas AP3A e AP3B. Os experimentos foram realizados em duplicada e os resultados mostrados nos gráficos representam as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Todos os inibidores (fosfato, fluoreto, molibdato, o-vanadato e pervanadato), apresentaram inibição do tipo competitiva. Dentre os inibidores estudados o molibdato apresentou um menor valor de K_i , mostrando que o mesmo interage com uma afinidade maior no sítio ativo de todas as isoformas do que os outros 4 inibidores.

Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e se ligar reversível e especificamente à carboidratos, e que não possuem natureza imunológica ou enzimática. Estas proteínas são particularmente abundantes em sementes e como normalmente as fosfatases ácidas de plantas são glicoproteínas, sua ligação com lectinas pode alterar suas atividades catalíticas, sendo a lectina, portanto, um possível regulador *in vivo* destas enzimas (CONRAD & RÜDIGER, 1994).

Selecionamos a concanavalina A como composto de estudo nas atividades enzimáticas, porque estudos prévios mostraram que esta lectina atuou como ativador da isoforma AP1 de soja quando o pNPP foi utilizado como substrato.

A ConA apresentou um efeito ativador somente na atividade da isoforma AP1 (Tabela 8).

Tabela 8

Efeito da ConA na atividade das fosfatases ácidas

As quatro isoformas enzimáticas AP1, AP2, AP3A e AP3B foram incubadas na ausência e em presença de ConA (50 µg), e a atividade foi determinada como descrito em Métodos (3.2.4.a). As atividades na ausência de ConA foram consideradas como 100%.

Isoforma	Atividade relativa (%)
AP1	137 (±4)
AP2	94 (±5)
AP3A	103 (±3)
AP3B	98 (±6)

Este resultado, com a ConA ativando apenas a fração AP1, confirma o que foi observado durante a purificação das fosfatases ácidas de sementes de soja, pois das quatro isoformas, somente esta fração se ligou à resina de ConA-sepharose (FERREIRA et alii, 1998a).

A Figura 16 mostra o efeito da concentração da Concanavalina A na atividade da isoforma AP1. O efeito ativador foi independente do substrato utilizado e o aumento máximo da atividade foi de cerca de 57%, e se deu quando a lectina foi utilizada numa concentração de 50 µg; em concentrações maiores este efeito não foi aumentado. A ativação da isoforma AP1 não foi dependente do tempo de pré-incubação, pois quando a enzima foi pré-incubada com a ConA por até 30 minutos o nível de ativação não foi alterado (Figura 17). Este resultado foi diferente dos encontrados na literatura, pois normalmente a ativação de outras fosfatases por lectinas somente ocorria quando se realizava pré-incubação de pelo menos 15 minutos (FERENS & MORAWIECKA, 1985).

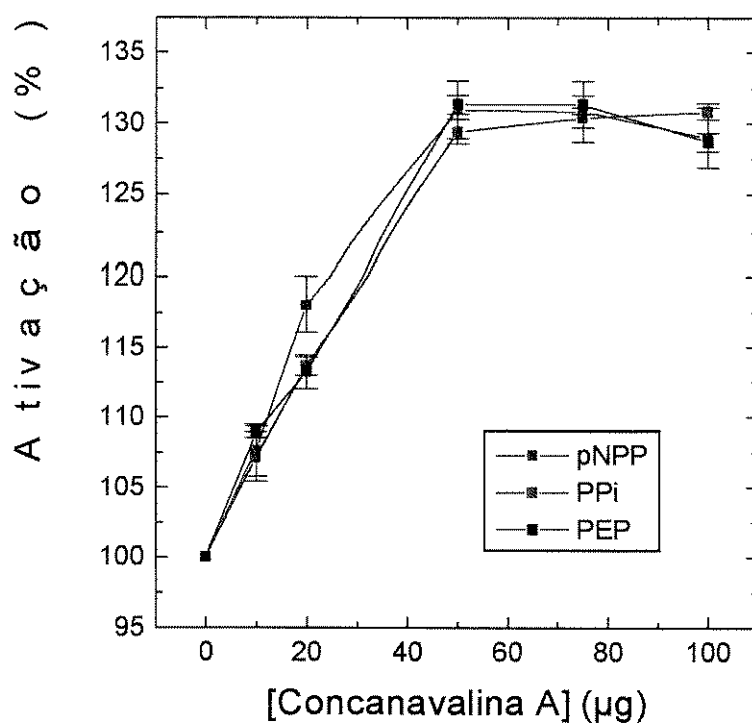


Figura 16 – Efeito da concentração de ConA na atividade da isoforma AP1

A atividade da enzima para três substratos diferentes, pNPP, PPi e PEP, foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b variando-se a concentração de ConA de 0-100 µg. O experimento foi realizado em triplicata e as barras indicam os desvios padrões.

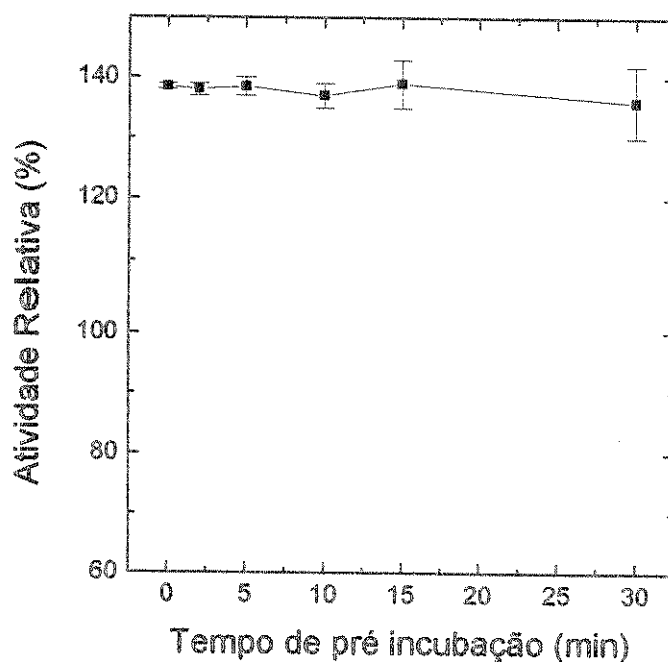


Figura 17 – Efeito do tempo de pré-incubação da ConA com a isoforma AP1

A enzima foi pré-incubada com a ConA e tampão acetato 0,1M pH 5,0 em diferentes tempos. Logo após a atividade foi determinada medindo-se a formação do p-nitrofenol de acordo com método 3.2.4a. O experimento foi realizado em duplicata e os valores mostrados no gráfico representam as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Afim de comprovar se a ativação da isoforma AP1 por ConA envolvia o resíduo de carboidrato desta enzima, estudou-se o efeito de diferentes açúcares. Açúcares como glicose e metilmanopiranosídeo impediram a ativação da fosfatase pela ConA (Tabela 9), o que comprova que o efeito da lectina se dá pela interação da mesma com a porção de carboidrato da enzima, uma vez que a ConA se liga especificamente aos resíduos de glicose ou manose. Quando a lactose estava no meio de reação juntamente com a ConA, a ativação não foi alterada, reforçando a especificidade pelos açúcares, acima mencionado. Normalmente para a ConA se ligar à açúcares é necessário a presença dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . No entanto quando os mesmos foram adicionados ao meio de reação contendo a fosfatase na presença da lectina não houve aumento significativo da atividade da enzima (Tabela 9).

A presença de ConA no meio de reação causou aumento da $V_{\text{máx}}$ em torno de 30% e a afinidade da enzima pelos substratos pNPP, PPi e PEP também foi aumentada (Tabela 10). A constante de especificidade ($V_{\text{máx}}/K_m$) aumentou cerca de 6 para o pNPP e 4 vezes para PPi e PEP. Este resultado mostra que possivelmente a ConA e outras lectinas podem exercer importante papel regulatório na atividade de fosfatases e de outras enzimas, uma vez que promovem uma interação enzima-substrato mais eficiente.

Tabela 9**Efeito de diferentes açúcares na atividade das fosfatases**

A atividade foi determinada de acordo com métodos 3.2.4a na presença e ausência do composto. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Composto	Atividade Relativa (%)
Sem adição	100
ConA (50µg)	139 (±5)
ConA (50µg) + Ca ²⁺ + Mn ²⁺ (1 mM)	147 (±5)
Glicose 100 mM	99 (±4)
ConA (50µg) + Glicose 100 mM	104 (±2)
Metilmanopiranosídeo 100 mM	95 (±6)
ConA (50µg) + Metilmanopiranosídeo 100 mM	100 (±3)
Lactose 100 mM	97 (±5)
ConA (50µg) + Lactose 100 mM	135 (±6)

Tabela 10**Efeito da Concanavalina A nos parâmetros cinéticos da isoforma AP1**

A atividade foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ (μ moles) e K_m (mM) foram determinados pelo gráfico de duplos-recíprocos (Lineweaver-Burk)

Substrato	- ConA		+ 50 μ g ConA	
	$V_{m\acute{a}x}$	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$	K_m
PNPP	114 (± 4)	0,49 ($\pm 0,020$)	152 (± 5)	0,102 ($\pm 0,004$)
PPi	121 (± 5)	0,13 ($\pm 0,010$)	165 (± 4)	0,050 ($\pm 0,007$)
PEP	89 (± 5)	0,23 ($\pm 0,012$)	120 (± 7)	0,088 ($\pm 0,003$)

Substratos Fisiológicos

Quanto ao estudo de especificidade das fosfatases ácidas de sementes de soja, as isoformas AP3A e AP3B, foram menos específicas do que as isoformas AP1 e AP2 (Tabela 11). As 4 isoformas apresentaram significativa atividade para TyrP, PEP e PPi. Os compostos Glic6P, Frut6P, AMP, Frut1,6 diP, ácido fosfoglicônico foram mais significativamente hidrolisados pelas isoformas AP3A e AP3B.

Analisando-se a Tabela 11, pode-se dizer que as 4 isoformas contendo atividade fosfatásica purificadas de sementes quiescentes de soja, pertencem à categoria de fosfatases ácidas inespecíficas, característica comum às fosfatases ácidas de plantas (DUFF et alii, 1994). Os resultados sugerem que as mesmas podem apresentar importante papel metabólico, uma vez que atuaram sobre intermédios-chaves do metabolismo de plantas.

O ácido fítico (inositol hexafosfato) está presente em quantidades significativas em sementes (DUFF et alii, 1994), o qual é hidrolisado em Pi e inositol durante a germinação, por fitases (fosfatases ácidas que hidrolisam o ácido fítico) (GIBSON & ULLAH, 1988). Nossos resultados mostram que nenhuma das 4 isoformas é fitase, pois as mesmas não hidrolisaram significativamente o ácido fítico.

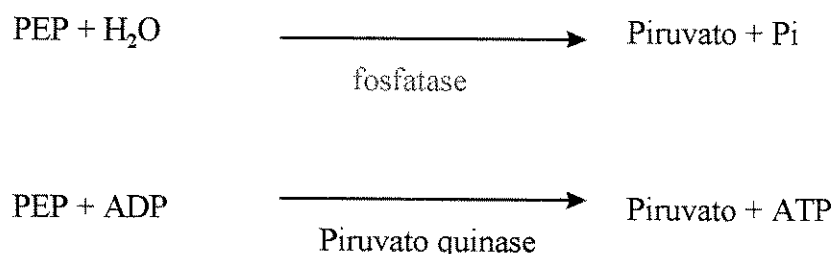
Tabela 11**Estudo da especificidade por substratos nas atividades das fosfatases ácidas de sementes de soja**

As atividades foram determinadas como descrito em Métodos, na presença de 5 mM de cada substrato. A atividade quando o pNPP foi utilizado como substrato foi considerada 100%. Os experimentos foram realizados em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Substrato	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
PEP	78 ($\pm$ 5)	78 ($\pm$ 3)	96 ($\pm$ 3)	97 ($\pm$ 4)
Tirosina-P	82 ($\pm$ 3)	80 ($\pm$ 1)	83 ($\pm$ 3)	86 ($\pm$ 1)
Serina-P	24 ($\pm$ 1)	42 ($\pm$ 2)	67 ($\pm$ 1)	59 ($\pm$ 2)
FMN	32 ($\pm$ 2)	14 ($\pm$ 2)	41 ($\pm$ 2)	49 ($\pm$ 2)
Pirofosfato	67 ($\pm$ 3)	81 ($\pm$ 3)	96 ($\pm$ 4)	78 ($\pm$ 2)
Ác. Fítico	10 ($\pm$ 1)	3 ($\pm$ 1)	14 ($\pm$ 1)	17 ($\pm$ 1)
Glicose 1-P	9 ($\pm$ 1)	7 ($\pm$ 1)	47 ($\pm$ 1)	44 ($\pm$ 1)
Glicose 6-P	28 ($\pm$ 1)	6 ($\pm$ 1)	54 ($\pm$ 1)	56 ($\pm$ 2)
AMP	20 ($\pm$ 1)	12 ($\pm$ 1)	56 ($\pm$ 2)	53 ($\pm$ 2)
Frutose 6-P	35 ($\pm$ 2)	14 ($\pm$ 2)	55 ($\pm$ 2)	57 ($\pm$ 1)
Frutose 1,6 di-P	31 ($\pm$ 1)	22 ($\pm$ 1)	58 ($\pm$ 3)	62 ($\pm$ 4)
Ác. P-Glicônico	55 ($\pm$ 3)	33 ($\pm$ 1)	82 ($\pm$ 1)	72 ($\pm$ 3)

Caracterização cinética utilizando PEP como substrato

O PEP é um importante intermediário do metabolismo de plantas. O mesmo, ao contrário do que acontece em animais, pode ser convertido diretamente em piruvato, em plantas, por duas vias:



A reação catalisada pela fosfatase é uma reação de desvio, e ocorre normalmente em casos de adaptações bioquímicas, decorrentes de limitações de nutrientes, excesso de água, anóxia, seca, etc (PLAXTON, 1996). Esta via tem a vantagem de “economizar” ADP, quando a planta está em condições limitantes de nutrientes, e ao mesmo tempo libera Pi. O fósforo é importante para o crescimento da planta e constituinte estrutural de muitas biomoléculas.

O PEP foi significativamente hidrolisado pelas 4 isoformas, cerca de 80% para AP1 e AP2, e acima de 95% para AP3A e AP3B, quando comparado com o substrato sintético, pNPP (Tabela 11), o que mostra que estas enzimas podem ter importante papel metabólico para a soja.

O estudo do efeito de pH (Figura 18) mostra que o mesmo tem importante papel na regulação da atividade das fosfatases. A isoforma AP1 apresentou pH ótimo em torno de 4,0-4,5, AP2 em pH 6,0, AP3A em pH 5 e AP3B numa faixa de 4,5-6,0. Em pH 6,0, a isoforma AP1, apresentou cerca de 15% da atividade, quando comparada com a atividade no pH 4,0-4,5.

Nos estudos cinéticos, as atividades das isoformas foram determinadas nos seus pHs ótimos, ou seja pH 4,5; 6; 5 e 5, para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente.

A Tabela 12 mostra os parâmetros cinéticos obtidos quando o pNPP e PEP foram utilizados como substratos. As isoformas AP3A e AP3B apresentaram menores valores de K_m (0,099 e 0,078, respectivamente). Os valores de K_m foram semelhantes aos obtidos para a fosfatase ácida de células de mostarda em cultura - 0,05 mM (PEP) e 0,55 (pNPP) (DUFF et al, 1989).

Uma reação enzimática é melhor analisada através da chamada constante de especificidade, que é a razão entre a $V_{m\acute{a}x}$ e a K_m . Sendo assim, a constante de especificidade das 4 isoformas, para a hidrólise do PEP, pode ser listada da seguinte forma: AP1 > AP3A > AP3B > AP2.

Nossos resultados mostram que para AP1 e AP3A o PEP é melhor substrato que o composto sintético pNPP.

A importância da determinação de parâmetros cinéticos no estudo da especificidade de uma enzima por substratos fica patente quando se compara, por exemplo, as isoformas AP1 e AP2. Segundo os dados da Tabela 11, ambas as

isoformas hidrolisam igualmente o PEP (78%, com relação ao pNPP). Por outro lado, examinando-se os valores das constantes de especificidade (Tabela 12), observa-se que o PEP, com uma constante cerca de 10 vezes maior, é um melhor substrato para a isoforma AP1 do que para AP2. Resultados similares também serão observados para estas isoformas com relação aos substratos tirosina fosfato e pirofosfato (ver adiante).

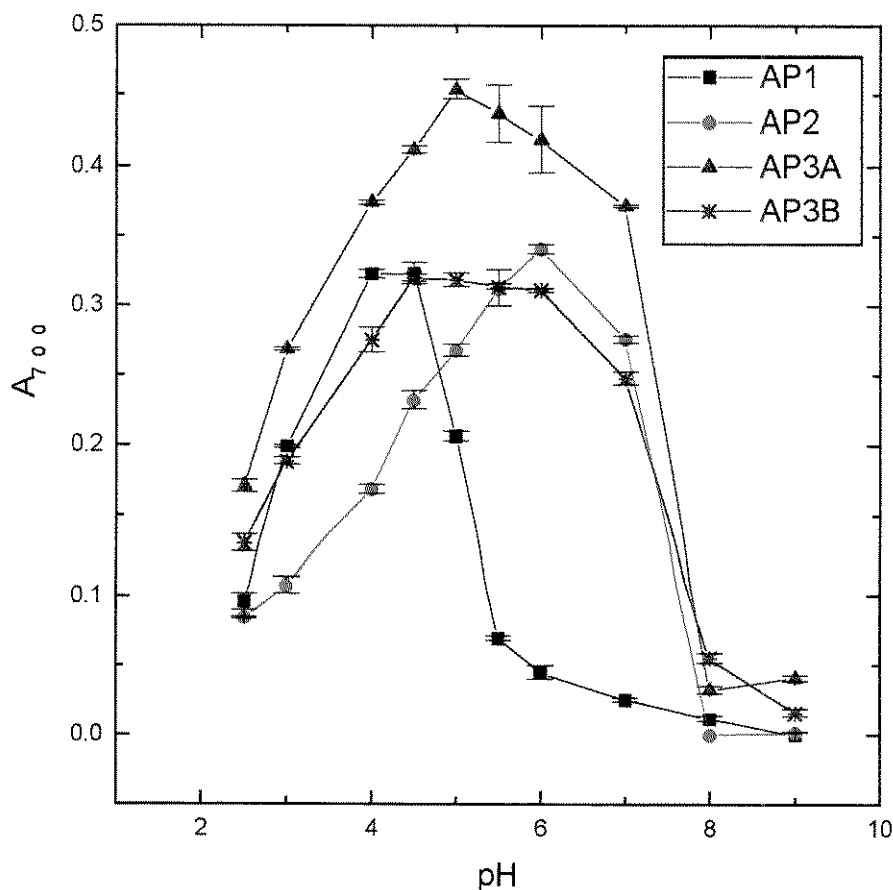


Figura 18 - Efeito do pH na atividade das 4 isoformas de fosfatases ácidas com PEP como substrato.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b, utilizando PEP (5 mM) como substrato e tempo de reação de 10 minutos. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM foram: Glicina (pH 2,5, 3,0 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5) Bis-Tris (pH 6,0), Imidazol (pH 7,0 e 8,0). O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os erros padrões.

Tabela 12**Determinação dos parâmetros cinéticos com PEP como substrato**

Os parâmetros cinéticos foram determinados através do gráfico de duplos recíprocos como descrito em método 3.2.7c. O experimento foi realizado em duplicata, os valores entre parênteses representam os seus desvios padrões.

Isoforma	Substrato	V_{máx} (μmol/min)	K_m (mM)	V_{máx} /K_m
AP1	pNPP	114 (±4)	0,49 (±0,020)	233 (±3)
	PEP	89 (±5)	0,23 (±0,010)	387 (±5)
AP2	pNPP	22 (±1)	0,38 (±0,020)	58 (±2)
	PEP	17 (±3)	0,47 (±0,017)	36 (±4)
AP3A	pNPP	37 (±2)	0,20 (±0,017)	185 (±3)
	PEP	35 (±3)	0,099 (±0,005)	353 (±4)
AP3B	pNPP	16 (±3)	0,086 (±0,004)	186 (±5)
	PEP	16 (±2)	0,078 (±0,007)	205 (±6)

Ao contrário da fosfatase ácida de cultura de células de mostarda, que foi ativada cerca de 1,7 vezes na presença de Mg^{2+} (DUFF et al, 1989), e da fosfatase ácida purificada de sementes de feijão em germinação, que teve sua atividade perdida após a diálise e retirada de Mg^{2+} (MALHOTRA et al, 1990), as 4 isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja não tiveram suas atividades modificadas na presença deste metal (Tabela 13). O Cu^{2+} apresentou maior efeito inibitório quando o pNPP foi utilizado como substrato, para as isoformas AP1 e AP2 (atividade relativa de 41 e 33%, respectivamente), e o Zn^{2+} apresentou menor efeito quando este substrato foi utilizado para as isoformas AP3A e AP3B (atividade relativa de 82 e 88%, respectivamente) (FERREIRA, 1995).

A Tabela 14, mostra o efeito de alguns compostos nas atividades das fosfatases, quando o PEP foi utilizado como substrato. Molibdato, fluoreto, etanol e glicerol mostraram efeito inibitório. SDS (detergente aniônico), Triton X-100 (detergente neutro) e BSA não apresentaram efeito nas atividades. Estes resultados foram diferentes dos obtidos anteriormente, quando o pNPP foi utilizado como substrato, pois neste caso, as 4 isoformas eram fortemente inibidas pelo SDS e a isoforma AP1 era ativada cerca de 40% pelo triton X-100 e BSA (FERREIRA, 1995).

Tabela 13

Efeito de Metais nas atividades das fosfatases ácidas de sementes de soja, com PEP como substrato

As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito em Métodos, em presença de 1 mM de metal. A atividade enzimática na ausência de metal foi considerada 100%. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Metal	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
Mn ²⁺	103 (±5)	66 (±3)	79 (±6)	82 (±5)
Cu ²⁺	89 (±3)	112 (±7)	70 (±4)	53 (±7)
Ca ²⁺	97 (±6)	103 (±5)	80 (±2)	96 (±6)
Mg ²⁺	105 (±4)	102 (±2)	103 (±3)	100 (±3)
Zn ²⁺	46 (±2)	59 (±3)	47 (±5)	68 (±5)

Tabela 14

Efeito de compostos nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com PEP como substrato

A atividade enzimática na ausência de composto foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Composto	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
p-CMB 100 μ M	62 ($\pm$ 3)	98 ($\pm$ 5)	54 ($\pm$ 6)	57 ($\pm$ 5)
Molibdato 100 μ M	2 ($\pm$ 2)	4 ($\pm$ 3)	6 ($\pm$ 4)	7 ($\pm$ 5)
Tartarato 5 mM	87 ($\pm$ 4)	101 ($\pm$ 4)	102 ($\pm$ 4)	101 ($\pm$ 6)
Fluoreto 5 mM	61 ($\pm$ 5)	15 ($\pm$ 2)	14 ($\pm$ 3)	22 ($\pm$ 6)
Guanosina 1 mM	92 ($\pm$ 3)	102 ($\pm$ 3)	94 ($\pm$ 6)	105 ($\pm$ 8)
Etanol 10%	78 ($\pm$ 6)	85 ($\pm$ 6)	81 ($\pm$ 5)	90 ($\pm$ 4)
Glicerol 2 M	58 ($\pm$ 5)	57 ($\pm$ 3)	74 ($\pm$ 6)	75 ($\pm$ 5)
BSA 0,1 mg/mL	104 ($\pm$ 3)	116 ($\pm$ 4)	97 ($\pm$ 3)	106 ($\pm$ 6)
SDS 0,05%	81 ($\pm$ 7)	108 ($\pm$ 4)	90 ($\pm$ 4)	96 ($\pm$ 5)
Triton X-100 0,2%	104 ($\pm$ 3)	105 ($\pm$ 5)	99 ($\pm$ 7)	110 ($\pm$ 2)

Caracterização cinética utilizando PPi como substrato

O PPi é um importante intermediário do metabolismo de plantas em geral. Em muitas reações, o mesmo é utilizado como doador de Pi, em vez de serem utilizados os nucleotídeos - NTPs - (UTP, GTP, ATP). As 4 isoformas purificadas das sementes de soja hidrolisaram o PPi; entretanto as mesmas não podem ser consideradas pirofosfatases pois, diferentes destas, não foram específicas para o pirofosfato inorgânico (Tabela 11).

A isoforma AP1 apresentou pH ótimo para catálise em 4,2, as isoformas AP3A e AP3B em 5,5 e a isoforma AP2 em pH 7,0. Somente a isoforma AP1 não apresentou atividade em pHs acima de 5,5. As isoformas AP3A e AP3B, apresentaram alta atividade numa faixa mais ampla de pH de 4-7,5 (Figura 19).

Nos estudos cinéticos, as atividades das isoformas foram determinadas nos seus pHs ótimos, ou seja pH 4,2; 7; 5,5 e 5,5, para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente. As diferenças de atividades das 4 isoformas de fosfatase ácida em função do pH sugerem que este parâmetro pode ser um importante ponto de controle na regulação daquelas enzimas.

Quanto à eficiência catalítica (Tabela 15), as isoformas AP1 e AP3A, apresentaram maiores valores de constantes de especificidade para a hidrólise do PPi, quando comparados com pNPP, como ocorreu para o PEP (Tabela 12). Novamente aqui, para o PPi como substrato, fica evidente a importância de se determinar a constante de especificidade. Segundo a Tabela 11, a hidrólise de PPi

pela isoforma AP2 (81%) é ligeiramente superior quando comparada com AP1 (67%). Entretanto, os valores das constantes de especificidade mostram que AP1 possui uma eficiência catalítica 20 vezes maior que AP2.

Utilizando-se PPI como substrato, as 4 isoformas enzimáticas não foram inibidas por Cu^{2+} (Tabela 16), diferentemente da inibição por este metal com pNPP (FERREIRA et alii, 1998a); a isoforma AP2 foi ativada cerca de 30% por este metal. Nenhuma das isoformas foi ativada por Mg^{2+} (Tabela 16) e nem precisou deste metal no meio da reação, reforçando que as mesmas não devem ser pirofosfatases (DUFF et alii, 1994).

Os resultados obtidos no estudo do efeito de compostos (Tabela 17), foram similares quando comparados com pNPP (FERREIRA, et alii 1998a), com exceção da não ativação da isoforma AP1 pelo triton e BSA, como ocorreu quando pNPP foi utilizado.

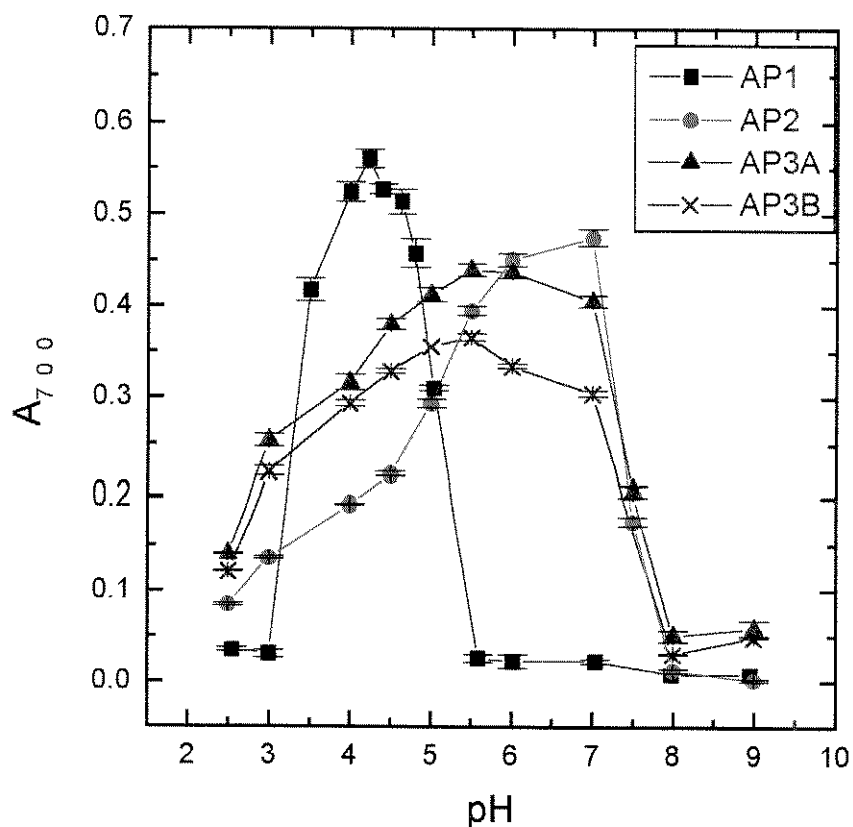


Figura 19 - Efeito do pH na atividade das 4 isoformas de fosfatases ácidas, com PPi como substrato.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b, em presença de 5 mM de PPi. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM foram: Glicina (pH 2,5, 3,0 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5) Bis-Tris (pH 6,0), Imidazol (pH 7,0 e 8,0). O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Tabela 15

Determinação dos parâmetros cinéticos com PPi como substrato

Os parâmetros cinéticos foram determinados através do gráfico de duplos recíprocos como descrito em método 3.2.6. O experimento foi realizado em duplicata, os valores entre parênteses representam os seus desvios padrões.

Isoforma	Substrato	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_m (mM)	$V_{\max}/K_m$
AP1	pNPP	114 (± 4)	0,49 ($\pm 0,020$)	233 (± 3)
	PPi	121 (± 5)	0,13 ($\pm 0,010$)	931 (± 5)
AP2	pNPP	22 (± 1)	0,38 ($\pm 0,020$)	58 (± 2)
	PPi	25 (± 3)	0,57 ($\pm 0,017$)	44 (± 4)
AP3A	pNPP	37 (± 2)	0,20 ($\pm 0,017$)	185 (± 3)
	PPi	47 (± 3)	0,16 ($\pm 0,011$)	294 (± 4)
AP3B	pNPP	16 (± 3)	0,086 ($\pm 0,004$)	186 (± 5)
	PPi	19 (± 2)	0,17 ($\pm 0,019$)	112 (± 6)

Tabela 16
Efeito de Metais nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com PPI
como substrato

As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito em Métodos, em presença de 1 mM de metal. A atividade enzimática na ausência de metal foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Metal	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
Mn ²⁺	105 (±5)	72 (±3)	78 (±4)	98 (±5)
Cu ²⁺	118 (±3)	134 (±8)	98 (±3)	105 (±3)
Ca ²⁺	97 (±2)	85 (±53)	96 (±2)	100 (±2)
Mg ²⁺	103 (±6)	85 (±6)	99 (±2)	109 (±4)
Zn ²⁺	99 (±4)	44 (±5)	69 (±3)	74 (±6)

Tabela 17
Efeito de compostos nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com
PPi como substrato.

A atividade enzimática na ausência de composto foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Composto	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
pCMB 100 μ M	96 ($\pm$ 5)	80 ($\pm$ 4)	83 ($\pm$ 4)	100 ($\pm$ 5)
Molibdato 100 μ M	0	2 ($\pm$ 3)	5 ($\pm$ 3)	0
Tartarato 5 mM	83 ($\pm$ 4)	90 ($\pm$ 6)	81 ($\pm$ 3)	99 ($\pm$ 3)
Fluoreto 5 mM	41 ($\pm$ 3)	54 ($\pm$ 2)	60 ($\pm$ 4)	38 ($\pm$ 5)
Guanosina 1 mM	94 ($\pm$ 5)	100 ($\pm$ 3)	103 ($\pm$ 5)	98 ($\pm$ 4)
Etanol 10%	63 ($\pm$ 7)	68 ($\pm$ 8)	60 ($\pm$ 6)	58 ($\pm$ 6)
Glicerol 2 M	52 ($\pm$ 4)	50 ($\pm$ 7)	63 ($\pm$ 3)	69 ($\pm$ 7)
BSA 0,1 mg/mL	107 ($\pm$ 3)	100 ($\pm$ 6)	99 ($\pm$ 2)	103 ($\pm$ 5)
SDS 0,05%	0	5 ($\pm$ 2)	7 ($\pm$ 3)	3 ($\pm$ 2)
Triton X-100 0,2%	110 ($\pm$ 6)	98 ($\pm$ 5)	100 ($\pm$ 5)	101 ($\pm$ 4)

Caracterização cinética utilizando TyrP como substrato

As 4 isoformas hidrolisaram a TyrP, sugerindo que as mesmas poderiam atuar sobre proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina e assim ter um importante papel na regulação do metabolismo, uma vez que, assim como em tecidos animais, a regulação do metabolismo em plantas por desfosforilação é muito importante (BUDDE et alii, 1988).

O estudo do efeito do pH (Figura 20) mostra que a isoforma AP1 apresenta pH ótimo em 4,5, as isoformas AP3A e AP3B em 5,5 e a isoforma AP2 apresentou atividade máxima em pH 7.

Nos estudos cinéticos, as atividades das isoformas foram determinadas nos seus pHs ótimos, ou seja pH 4,5; 7; 6; 5,5, para as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente.

As isoformas AP1 e AP2 (Tabela 18) apresentaram valores de Km próximos ao encontrado por GELLATLY et alii (1994) para uma fosfatase de tubérculos de batata a qual foi classificada por estes autores como fosfotirosina fosfatase ácida (Km para TyrP de 0,99 mM). Já as isoformas AP3A e AP3B apresentaram maior afinidade por este substrato que as outras duas, embora a isoforma AP3A tenha apresentado maior eficiência catalítica (maior constante de especificidade) para a hidrólise da TyrP. Diferentemente do que ocorreu com PEP e PPi que foram excelentes substratos para a isoforma AP1, o mesma não reconhece eficientemente a TyrP. Este fato tem a sua importância no sentido de mostrar que as 4 isoformas de fosfatase ácida de sementes de soja podem ter diferentes funções no metabolismo.

Os resultados dos estudos dos efeitos de metais e compostos (Tabelas 19 e 20) quando a TyrP foi utilizada como substrato, foram similares aos obtidos para o pNPP (FERREIRA et alii,1998a). As 4 isoformas diferem da fosfatase ácida purificada de tubérculos de batata (GELLATLY et alii 1994), ativada pelo Mg^{2+} .

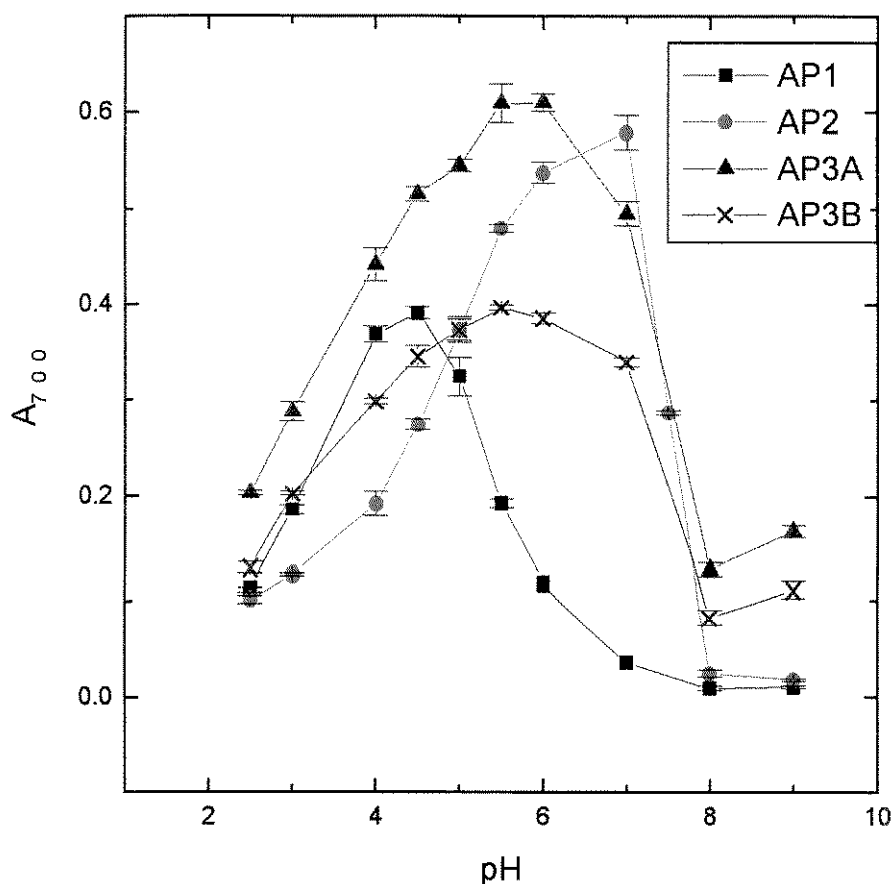


Figura 20 - Efeito do pH na atividade das 4 isoformas de fosfatases ácidas, com tirosina fosfato como substrato.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b, em presença de 5 mM de TyrP. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM foram: Glicina (pH 2,5, 3,0 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5) Bis-Tris (pH 6,0), Imidazol (pH 7,0 e 8,0). O experimento foi realizado em triplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e desvios padrões.

Tabela 18**Determinação dos parâmetros cinéticos com tirosina fosfato como substrato**

Os parâmetros cinéticos foram determinados através do gráfico de duplos recíprocos como descrito em método 3.2.6. O experimento foi realizado em duplicata, os valores entre parênteses representam os seus desvios padrões.

Isoforma	Substrato	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_m (mM)	$V_{\text{máx}}/K_m$
AP1	pNPP	114 (± 4)	0,49 ($\pm 0,020$)	233 (± 3)
	TyrP	81 (± 6)	1,00 ($\pm 0,120$)	81 (± 5)
AP2	pNPP	22 (± 1)	0,38 ($\pm 0,020$)	58 (± 2)
	TyrP	30 (± 5)	1,06 ($\pm 0,270$)	28 (± 4)
AP3A	pNPP	37 (± 2)	0,20 ($\pm 0,017$)	185 (± 3)
	TyrP	42 (± 4)	0,15 ($\pm 0,010$)	280 (± 4)
AP3B	pNPP	16 (± 3)	0,086 ($\pm 0,004$)	186 (± 5)
	TyrP	21 (± 3)	0,14 ($\pm 0,012$)	150 (± 4)

Tabela 19

**Efeito de metais nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com
tirosina fosfato como substrato**

As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito em Métodos, em presença de 1 mM de metal. A atividade enzimática na ausência de metal foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Metal	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
Mn ²⁺	90 (±4)	96 (±3)	110 (±5)	104 (±3)
Cu ²⁺	70 (±5)	89 (±6)	65 (±9)	58 (±8)
Ca ²⁺	100 (±5)	98 (±3)	103 (±5)	102 (±3)
Mg ²⁺	100 (±5)	95 (±3)	102 (±3)	103 (±5)
Zn ²⁺	46 (±5)	57 (±4)	80 (±5)	76 (±3)

Tabela 20

Efeito de compostos nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com tirosina fosfato como substrato

A atividade enzimática na ausência de composto foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

Composto	Atividade Relativa (%)			
	AP ₁	AP ₂	AP3A	AP3B
PCMB 100 μ M	90 ($\pm$ 4)	95 ($\pm$ 3)	100 ($\pm$ 6)	100 ($\pm$ 5)
Molibdato 100 μ M	2 ($\pm$ 3)	7 ($\pm$ 3)	6 ($\pm$ 4)	10 ($\pm$ 4)
Tartarato 5 mM	96 ($\pm$ 5)	102 ($\pm$ 6)	100 ($\pm$ 5)	101 ($\pm$ 7)
Fluoreto 5 mM	40 ($\pm$ 4)	25 ($\pm$ 3)	50 ($\pm$ 5)	56 ($\pm$ 4)
Guanosina 1 mM	100 ($\pm$ 5)	105 ($\pm$ 3)	96 ($\pm$ 4)	103 ($\pm$ 5)
Etanol 10%	79 ($\pm$ 4)	85 ($\pm$ 3)	90 ($\pm$ 5)	95 ($\pm$ 8)
Glicerol 2 M	85 ($\pm$ 3)	78 ($\pm$ 6)	70 ($\pm$ 3)	87 ($\pm$ 4)
BSA 0,1 mg/mL	102 ($\pm$ 7)	109 ($\pm$ 5)	96 ($\pm$ 4)	100 ($\pm$ 5)
SDS 0,05%	5 ($\pm$ 2)	7 ($\pm$ 4)	7 ($\pm$ 3)	15 ($\pm$ 5)
Triton X-100 0,2%	115 ($\pm$ 6)	111 ($\pm$ 3)	90 ($\pm$ 5)	113 ($\pm$ 6)

Caracterização cinética utilizando Glicose6P e Frutose6P como substratos

Os estudos cinéticos utilizando-se Glic6P e Frut6P foram realizados com as isoformas AP3A e AP3B, pois as mesmas apresentaram maior atividade relativa, para estes dois substratos (Tabela 11).

O pH ótimo para a catálise das duas isoformas foi de 5,5, para a Glic6P e Frut6P (Figura 21), com significante atividade na faixa de pH de 4-7.

Nos estudos cinéticos, as atividades das isoformas foram determinadas nos seus pHs ótimos, ou seja, pH 5,5 para as isoformas AP3A e AP3B.

A eficiência catalítica (medida pela constante de especificidade) para as duas isoformas foi menor quando comparado com o pNPP (Tabela 21). Com relação à hidrólise dos açúcares-fosfato, a isoforma AP3A é cerca de 3 vezes mais efetiva que AP3B.

O estudo de metais (Tabela 22) para as duas isoformas mostrou similaridade quando o pNPP foi utilizado (FERREIRA et alii, 1998a).

A Tabela 23 mostra o efeito de compostos na atividade das isoformas AP3A e AP3B; a isoforma AP3A foi ativada pelo triton X 100, detergente neutro, e pelo BSA, diferentemente do que ocorreu quando o pNPP foi utilizado como substrato (FERREIRA et alii, 1998a). A guanosina, assim como o Triton e BSA, ativou a isoforma AP3B, somente quando a Frut6P foi utilizada como substrato. As 2 isoformas foram fortemente inibidas pelo p-cloromercuribenzoato (pCMB) quando

os dois substratos foram utilizados, diferentemente ao observado quando o pNPP foi utilizado como substrato (FERREIRA et alii, 1998a).

Os resultados com os potenciais substratos fisiológicos mostraram que as isoformas AP1 e AP3A reconhecem alguns deles com uma eficiência muito grande (quando comparado com o substrato sintético pNPP). Ficou também evidente, que independente do substrato, Mg^{2+} não tinha qualquer efeito nas atividades das 4 isoformas. Com a exceção da isoforma AP3B com Frut6P como substrato, guanosina não mostrou nenhum efeito nas atividades enzimáticas. Este composto é um ativador de fosfatases ácidas de mamíferos (TANIZAKI et alii, 1977; GRANJEIRO, 1994).

Os estudos de pH mostraram que independentemente do substrato estudado a isoforma AP1 apresentava um pH ótimo para catálise em torno de 4,5; AP2, em torno de 6,5-7,0; AP3A e AP3B eram ativas em uma faixa mais ampla de pH, de 4,5-7,0.

Entretanto, algumas inibições eram dependentes do substrato utilizado, por exemplo, as atividades enzimáticas eram mantidas em presença de SDS quando o substrato era PEP; as isoformas AP3A e AP3B eram fortemente inibidas por pCMB em presença de Glic6P e Frut6P como substratos.

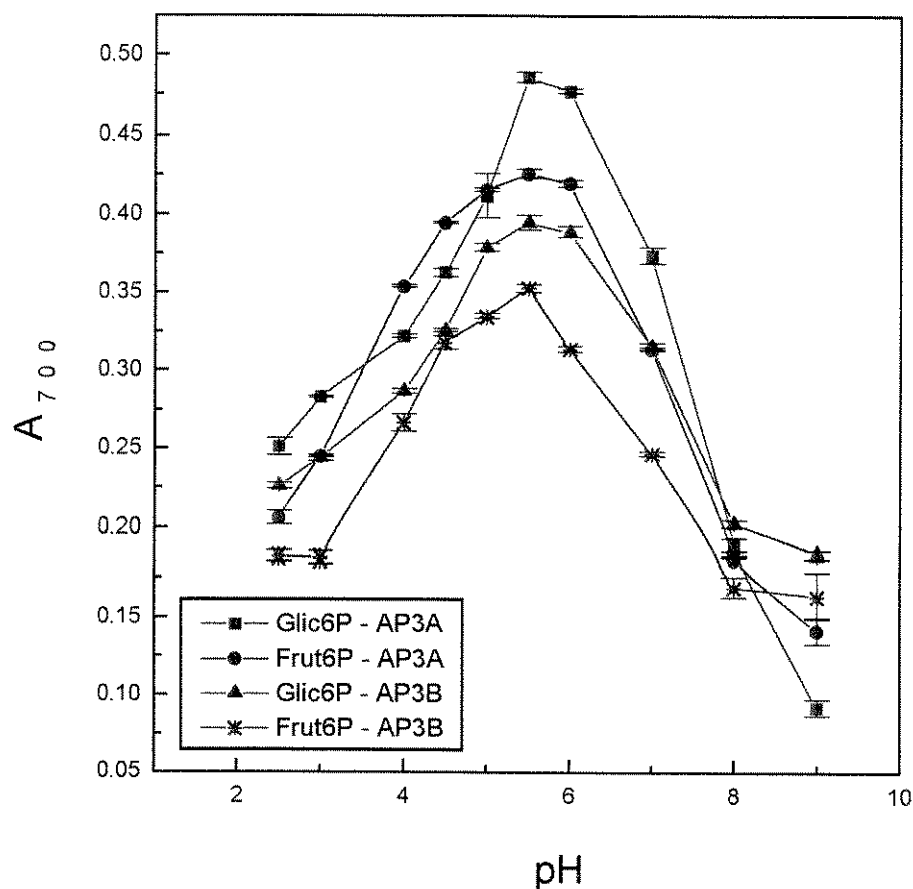


Figura 21 - Efeito do pH nas atividades das isoformas AP3A e AP3B, com glicose 6P e frutose 6P como substratos.

Atividade enzimática foi determinada de acordo com métodos 3.2.4b, utilizando-se 5 mM de Glic6P e Frut6P. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM foram: Glicina (pH 2,5, 3,0 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5) Bis-Tris (pH 6,0), Imidazol (pH 7,0 e 8,0). O experimento foi realizado em duplicata e o resultado mostrado no gráfico representa as suas médias e as barras, os desvios padrões.

Tabela 21

Determinação dos parâmetros cinéticos com glicose 6P e frutose 6P como substrato

Os parâmetros cinéticos foram determinados através do gráfico de duplos recíprocos como descrito em método 3.2.6. O experimento foi realizado em duplicata, os valores entre parênteses representam os seus desvios padrões.

Isoforma	Substrato	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_m (mM)	$V_{\text{máx}}/K_m$
AP3A	pNPP	37 (± 2)	0,20 (± 0.017)	185 (± 5)
	Glic6P	30 (± 3)	0,30 (± 0.028)	100 (± 4)
	Frut6P	18 (± 3)	0,16 (± 0.031)	112 (± 4)
AP3B	pNPP	16 (± 3)	0,086 (± 0.004)	186 (± 5)
	Glic6P	11 (± 2)	0,31 (± 0.027)	35 (± 2)
	Frut6P	11 (± 2)	0,33 (± 0.045)	33 (± 3)

Tabela 22

Efeito de metais nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja, com glicose-6P e frutose-6P como substratos

As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito em Métodos, em presença de 1 mM de metal. A atividade enzimática na ausência de metal foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.4b. O experimento foi realizado em duplicata e em todos os casos o desvio padrão foi menor que 5%.

Metal	Atividade relativa (%)			
	AP3A		AP3B	
	Glic6P	Frut6P	Glic6P	Frut6P
Mn ²⁺	96	79	96	76
Cu ²⁺	35	36	46	49
Ca ²⁺	80	70	79	96
Mg ²⁺	102	100	105	110
Zn ²⁺	34	47	42	68

Tabela 23

Efeito de compostos nas atividades de fosfatases ácidas de sementes de soja com glicose 6P e frutose 6P como substratos

A atividade enzimática na ausência de composto foi considerada 100%, e determinada como descrito em método 3.2.6. O experimento foi realizado em duplicata e os valores dos desvios padrões foram menores que 5%.

Composto	Atividade Relativa (%)			
	AP3A		AP3B	
	Glic6P	Frut6P	Glic6P	Frut6P
pCMB 100 μ M	6	19	5	9
Molibdato 100 μ M	7	10	8	14
Tartarato 5 mM	107	112	106	123
Fluoreto 5 mM	81	95	82	98
Guanosina 1 mM	98	122	102	130
Etanol 10%	70	80	61	52
Glicerol 2 M	56	55	88	68
BSA 0,1 mg/mL	113	126	110	137
SDS 0,05%	68	64	52	55
Triton X-100 0,2%	150	131	109	140

5 - CONCLUSÃO

As 4 isoformas de fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja parecem apresentar importante papel na aquisição de fosfato, uma vez que as mesmas podem ser enquadradas na categoria de fosfatases que apresentam baixa especificidade pelo substrato, muito embora, entre elas AP1 e AP2 mostrem uma maior especificidade que AP3A e AP3B. Este comportamento pode ser importante durante a germinação das sementes, pois neste período o fósforo é necessário para o crescimento e desenvolvimento normal da planta. Estas fosfatases presentes nas sementes quiescentes podem portanto, participar em diferentes vias metabólicas a fim de tornar este nutriente acessível para a planta. Outro fato importante é que estas isoformas podem participar também de vias de desvio quando o fosfato estiver limitante, “economizando” metabólitos importante, como os nucleotídeos.

Este trabalho também contribuiu para mostrar o importante papel do pH, uma vez que o mesmo pôde servir de fino controle de diferentes vias metabólicas onde diferentes substratos foram utilizados. Para os substratos estudados, a isoforma AP1 mostrou um pH ótimo em torno de 4; AP2 em torno de 6-7; e AP3A e AP3B, uma faixa mais ampla de pH, de 4,5 a 7. Este fato é importante, pois dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, certos hormônios como os ácidos giberélico e abscísico podem provocar alteração do pH do meio, acidificando-o. Portanto, uma ou outra isoforma poderá ter sua atividade catalítica favorecida, o que explica a necessidade da presença, em um dado tecido, de diferentes isoformas de enzimas.

O estudo da especificidade por substratos também foi importante pois permitiu diferenciar as 4 isoformas. AP3A e AP3B, diferentemente da AP1 e AP2 hidrolizaram açúcares fosfato, podendo contribuir no metabolismo de carboidratos.

Além dos estudos com substratos, inibidores também permitem inferir sobre mecanismos de reação. Por exemplo, AP3A e AP3B parecem ser mais sensíveis que AP1 e AP2 com relação a Cu^{2+} e pCMB, reagentes específicos de grupamentos -SH.

A capacidade das isoformas de hidrolisar aminoácidos fosforilados indica o possível envolvimento destas enzimas em processos de regulação por desfosforilação em resíduos de treonina, serina e tirosina em proteínas; este fato pôde ser reforçado pela sensibilidade destas enzimas ao vanadato e pervanadato, inibidores típicos de proteína fosfatases. Estudos com alguns inibidores podem promover distinções na hidrólise de substratos. As inibições por Cu^{2+} e SDS são baixas quando PPI e PEP, respectivamente, foram utilizados como substratos.

Lectinas estão comumente presentes em plantas, principalmente em sementes. A maioria das proteínas de plantas por ser glicoproteína, pode interagir de forma específica e reversível com estas lectinas. No caso das isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja, pôde-se verificar um possível papel regulador exercido por lectinas, o qual foi dependente do substrato utilizado. Portanto, as lectinas apresentam um duplo papel regulador, pois seu poder de ligação com a isoforma depende do carboidrato presente na estrutura e sua capacidade de alterar parâmetros cinéticos depende do substrato utilizado.

Os estudos de estabilidade térmica nos permitiram criar um novo conceito sobre temperatura máxima de catálise, mostrando que esta temperatura depende do substrato utilizado e também dos produtos formados, pois os mesmos podem ter um importante papel estabilizante da enzima.

6 - PERSPECTIVAS

Este trabalho reforça a necessidade de se estudar as fosfatases ácidas sobre vários aspectos.

A presença de 4 isoformas multifuncionais em sementes de soja quiescentes torna importante os estudos das fosfatases ácidas durante a germinação, uma vez que pode-se fazer estudos comparativos das isoformas presentes nas sementes quiescentes e no estágio da germinação. Este estudo poderá ser realizado em conjunto com a utilização de anticorpos, pois deste modo pode-se monitorar o comportamento das isoformas em estágios diferentes do desenvolvimento, verificando-se a possível síntese de novas isoformas. Os estudos de germinação poderão ser feitos também para monitorar o efeito de certos compostos presentes no solo, como herbicidas e pesticidas, acompanhando-se a atividade das fosfatases; estas enzimas portanto, poderão servir como biossensores biológicos da qualidade do solo.

O isolamento de fosfatases ácidas de membranas também será importante para elucidar a possível participação destas enzimas em processo de transdução de sinal.

Um ponto que merece uma investigação mais cuidadosa é a estabilidade das isoformas em presença dos produtos fosfato e p-nitrofenol. Este dado poderia ser aproveitado no estágio inicial da purificação enzimática, onde por aquecimento a uma temperatura adequada, em presença daqueles compostos, a fosfatase ácida permaneceria estável e outras proteínas precipitariam por desnaturação.

Um outro aspecto de interesse consiste em um estudo mais detalhado das 4 isoformas de fosfatase ácida de sementes de soja utilizando-se inicialmente treonina-fosfato, e posteriormente proteína fosforilada em resíduos de treonina como substrato. Recentemente tem sido atribuído a essas atividades de proteínas fosfatases (juntamente com proteínas quinases) um papel importante na organização estrutural dos microtúbulos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIÑO J. PÉREZ-CALLEJÓN, E., CUNILLERA, N., CAMPS, M., POSAS, F. & FERRER, A. (1993) - **Protein phosphatases in higher plants: multicplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana***, *Plant Mol. Biol.*, 21: 475-485.
- BALDIJÃO, C. E. M., GUIJA, E., BITTENCOURT, H. M. S. & CHAIMOVICH, H. (1975) - **Steady state kinetics and effect of SH inhibitors on acid phosphatase from bovine brain**, *Biochim. Biophys. Acta*, 391: 316-325.
- BASHA, S.M. (1984) - **Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed**, *Can. J. Bot.*, 62:385-91.
- BARRETT-LENNARD, E. G., ROBSON, A. D. & GREENWAY H. (1982) - **Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves**, *J. Exp. Bot.*, 33:682-693.
- BECK, J. L., McCONCHIE, L. A., SUMMORS, A. C., ARNOLD, W, N., De JERSEY & ZERNER, B, (1986) - **Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme**, *Biochim. Biophys. Acta*, 869: 61-68.
- BHARGAVA, R. & SACHAR, R.C. (1987) - **Induction of acid phosphatase in cotton seedlings enzyme purification, subunit structure and kinetic properties**, *Phytochemistry*, 26:1293-1297.

- BISWAS, T.K. & CUNDIFF, C. (1991) - **Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinenses***, *Phytochemistry*, 30: 2119-2125.
- BITTENCOURT, H. & CHAIMOVICH, H. (1976) - **Importance of SH groups in catalysis by bovine brain acid phosphatase**, *Biochim. Biophys. Acta*, 438: 153-158.
- BOROUGHES, H. (1954) - **Studies on the acid phosphatases of green leaves**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49:30-42.
- BUDDE, R.J.A. & CHOLLET, R. (1988) - **Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation**, *Physiol. Plant.*, 72:435-439.
- CHAIMOVICH, H. & NOME, F. (1970) - **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
- CHENG, H.-F. & TAO, M. (1989) - **Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings**, *Biochim. Biophys. Acta*, 998:271-276.
- CHUNG, R. P-T. & POLYA, G. M. (1992) - **Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities**, *Plant Sci.*, 84: 153-162.
- COHEN, P. (1989) - **The structure and regulation of protein phosphatases**, *Ann. Rev. Biochem.*, 58:453-508.

- CONRAD, F. & RÜDIGER, H. (1994) - **The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase**, *Phytochemistry*, 30:277-283.
- DAVIS, J. P., ZHOU, M. & VAN ETEN, R. L. (1992) - **Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase**, *J. Biol. Chem.*, 269: 8734-8740.
- DE-KUNDU, P. & BANERJEE, A.C. (1990) - **Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *Vigna radiata***, *Phytochemistry*, 29:2825-2828.
- De-LEO, P. & SACHER J. A. (1970) - **Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections**, *Plant Physiol.*, 46: 806-811.
- DEWALD D. B., MASON H. S. & MULLET J. E. (1993) - **The soybean vegetative storage proteins VSP α and VSP β are acid phosphatases active on polyphosphates**, *J. Biol. Chem.*, 267: 15958-15964.
- DISHE, R. G. (1954) – **Carbohydrates Analyses**, *J. Biol. Chem.*, 42: 180-187.
- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1989) - **Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells**, *Plant Physiol.*, 90: 734-741.

- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1991) - **Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase**, *Arch. Biochem. Biophys.* 286:226-232.
- DUFF, S. M. G., SARATH, G. & PLAXTON, W. C. (1994) - **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism**, *Physiol. Plant.*, 90:791-800.
- FERENS, M. & MORAWIECKA, B. (1985) - **Rye germ acid phosphatase: properties of the enzyme and its activation by lectins**, *Phytochemistry*, 24:2839-2842.
- FERREIRA, C. V. (1995) – **Purificação e caracterização de fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes**. Tese de Mestrado – Instituto de Biologia/UNICAMP.
- FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. and AOYAMA, H. (1998a) – **Purification and characterization of multiple forms of soybean acid phosphatases**, *Plant Physiol. Biochem.* 36: 487-494.
- FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. and AOYAMA, H. (1998b) – **Soybean seed acid phosphatases: Unusual optimum temperature and thermal stability studies**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242: 282-286.

- FUJISAWA, K., KATSUMATA, Y. & YOSHINO M. (1993) - **Human seminal phosphatase: properties and comparison with plant phosphatases**, *Int. J. Biochem.*, 25: 627-630.
- GABARD, K. A. & JONES, R. L. (1986) - **Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley**, *Physiol. Plant.*, 67: 182-192.
- GELLATLY, K., MOORHEAD, G. B. G., DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1993) - **Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase**, *Plant. Physiol.*, 102:S-27.
- GIBSON, D. M. & ULLAH, A. H. J. (1988) - **Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 503-513.
- GONZÁLEZ, F. J., FAUSTE, C., BURGUILLO, F. J. & DOMINGUEZ A. (1993) - **Kinetic behaviour of a repressible acid phosphatase from the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1162: 17-27.
- GRABSKI, S., ARNOYS, E., BUSCH, B. & SCHINDLER, M. (1998) - **Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases**, *Plant Physiol.*, 116: 279-290.

- GRANJEIRO, J. M. (1994) - **Purificação e caracterização da fosfatase ácida do rim bovino**, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia/UNICAMP.
- GRANJEIRO, J. M., FERREIRA, C. V., JUCÁ, M.B., TAGA, E. M. and AOYAMA, H. (1997) - **Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics**, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41: 1201-1208.
- GUO, J. & PESACRETA, T. C. (1997) - **Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. var. sweet spanish**, *J. Plant Physiol.*, 151: 520-527.
- HAMMER, M. F., MARKWELL, J. & SARATH, G. (1997) - **Purification of a protein phosphatase from chloroplast stroma capable of dephosphorylating the light harvest complex-II**, *Plant Physiol.*, 113: 227-233.
- HAN, S. W., MICHELIN, M. A., BARBOSA, J. E. & ROSSI, A. (1994) - **Purification and constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa***, *Phytochemistry*, 30: 1131-1135.
- HARAGUCHI, H., YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA T. (1990) - **Multiple forms of acid phosphatase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings: immunological detection and quantitation**, *Plant Cell Physiol.*, 31: 917-923.

- HEFLER, S. K. & AVERILL, B. A. (1987) - The “manganese(III)-containing” purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146:1173-1177.
- JACOB, J.L. & SONTAG, N. (1974) - Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis*, *Biochimie*, 56:1315-1322.
- HUYER, G., LIU, S., KELLY, J., MOFFAT, J., PAYETTE, P., KENNEDY, B., TSAPRAILIS, G., GRESSE, M. J., and RAMACHANDRAN (1997) – Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate, *J. Biol. Chem.* 10: 843-851.
- KANEKO, T.S., KIKUTE, R. & KUBOTA, K. (1990) - Purification and properties of native cell wall acid phosphatase from cultured tobacco cells, *Phytochemistry*, 29:2883-2887.
- KANELIS, A. K., SOLOMOS, T. & MATTOO A. (1989) - Changes in sugars, enzymic activities and acid phosphatase isoenzyme profiles of bananas ripened in air or stored in 2,5% O₂ with and without ethylene, *Plant Physiol.*, 90: 251-258.
- KAWARASAKI, Y. NAKANO, H. & YAMANE, T. (1996) – Purification and some properties of wheat germ acid phosphatase. *Plant Sci.* 119: 67-77.
- KREBS, E.G. & BEAVO, J.A. (1979) - Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, 48:923-959.

- KRUZEL, M. & MORAWIECKA, B. (1982) - **Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Purification, properties, sugar and amino acid composition**, *Acta Biochim. Polon.*, 29:321-330.
- LAIDLER, P. M., TAGA, E. M. & VAN ETEN, R. L. (1982) - **Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 512-521.
- LAU, K.-H.W., FARLEY, J.R. & BAYLINK, D.J. (1987) - **Bone acid phosphatase is a neutral pH phosphotyrosyl protein phosphatase**, *Adv. Prot. Phosphatases*, 4:165-198.
- LEBANSKY, B. R., MCKNIGHT, T. D. & GRIFFING, L. R. (1992) - **Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures**, *Plant Physiol.*, 99: 391-395.
- LEE, R.B. (1988) - **Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells**, *New Phytol.*, 109:141-148.
- LEFEBVRE, D. D., DUFF, S. M. G., FIFE, C., PLAXTON, W. C. (1990) - **Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate**, *Plant Physiol.* 93:504-511.

- LIN, P.P.C. & KEY, J.L. (1980) - **Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties and substrate specificities**, *Plant Physiol.*, 66:360-367.
- LIN, Q., L., J., SMITH, R. D. & WALKER, J. C. (1998) – **Molecular cloning and chromosomal mapping of type one serine/threonine protein phosphatases in *Arabidopsis thaliana***, *Plant Mol Biol.*, 37:471-481.
- LINEWEAVER & BURK, D. (1934) - **The determination of enzyme dissociation constants**, *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-666.
- LOVELACE, J.K., DWYER, D.M. & GOTTLIEB, M. (1986) - **Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani***, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20:243-251.
- LOWRY O. H. & LOPEZ J. A. (1945) - **The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters**, *J. Biol. Chem.*, 162:421-424.
- MacKINTOSH, C. & COHEN, P. (1989) - **Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants**, *Biochem. J.*, 262:335-339.
- MALHOTRA, P. and KASTHA, A M. (1990). **Isolation and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from germinating mung beans (*Vigna radiata*)**, *Plant Physiol.* 93, 194-200.

- MIERNYK, J.A. (1992) - **Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures**, *Phytochemistry*, 31:2613-2616.
- MORRIS, M.F., WAHEED, A., RISLEY, J.M. & VAN ETEN, R.L. (1989) – **Carbohydrate removal fails to eliminate the heterogeneity of human prostatic acid phosphatase**, *Clin. Chim. Acta*, 182: 9-20.
- NEUMAN, H. (1968) - **Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase**, *J. Biol. Chem.*, 243:4671-4676.
- NINOMIYA, Y., UEKI, K. & SATO, S. (1977) - **Chromatographic separation of extracellular acid phosphatase of tobacco cells cultured under Pi-supplied and omitted conditions**, *Plant Cell Physiol.*, 18 413-420.
- PANARA, F., PASQUALINI, S. & ANTONIELLI, M. (1990) - **Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme**, *Biochim Biophys. Acta*, 1037:73-80.
- PARK, H.-S.C. & VAN ETEN, R.L. (1986) - **Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase**, *Phytochemistry*, 25(2):351-357.
- PASQUALINI, S., PANARA, F., BRACARDI, P. & ANTONIELLI, M. (1992) - **High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles**, *Phytochemistry*, 31:3703-3706.

- PENHEITER, A. R., DUFF, S. M. G. & SARATH, G. (1997) – **Soybean root nodule and acid phosphatase**, *Plant Physiol.* 114: 597-604.
- PLAXTON, W.C. (1996) – **Plant Metabolism**, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:185-214.
- POLYA, G.M. & HARITOU, M. (1988) - **Purification and characterization of two wheat-embryo protein phosphatases**, *Biochem. J.*, 251:357-363.
- RANDALL, D. D., & TOLBERT, N. E. (1971) - **3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. I. Isolation and characterization from sugarcane leaves**, *J. Biol. Chem.* 246:5510-5517.
- REID, T. W. & WILSON, I. B. (1971) - ***E. coli* alkaline phosphatase**. In *The Enzymes*, 2nd, IV:375-415. edited by Boyer, P. D. Academic Press., N. Y..
- RENGASAMY, A. SELVAM, R. & GNANAM, A. (1981) - **Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes of *Sorghum vulgare***, *Arch. Biochem. Biophys.*, 209:230-236.
- ROBERTS, D.W.A. (1956) - **The wheat leaf phosphatases. II. Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5.5**, *J. Biol. Chem.*, 222:259-270.
- ROCHE, M. J. (1931) - **Sur les phosphatases du sang**, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 13:841-856.
- ROSSI, A., PALMA, M. S., LEONE, F. A. & BRIGLIADOR, M. A. (1981) - **Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds**, *Phytochemistry*, 20:1823-1826.

- SCHELL, D., STIERHOF, Y.-D. & OVERATH, P. (1990) - **Purification and characterization of tartrate-sensitive acid phosphatase of *Trypanosoma brucei***, *FEBS Lett.*, 271:67-70.
- SHAW, J.G. (1966) - **Acid phosphatase from tobacco leaves**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117:1-9.
- SLACK, C.R., HATCH, M.D. & GOODCHILD, D.J. (1969) - **Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis**, *Biochem. J.*, 114:489-498.
- SMITH, R. D. & WALKER, J. C. (1996) – **Plant protein phosphatases**. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 101-125.
- STASWICK, P. E., PAPA, C., HUANG, J. & RHEE, Y. (1994) - **Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal**, *Plant Physiol.*, 104:49-57.
- STROTHER, S., SINGH, M., BERESFORD, G. & KNOX R. B. (1985) - **Phosphatases from pollen of *Brassica campestris* and *Lilium regale***, *Phytochemistry*, 24:1447-1449.
- SUGIURA, Y. KAWABE, H., TANAKA, H., FUJIMOTO, S. & OHARA, A. (1981)- **Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese (III)-containing acid phosphatase**, *J. Biol. Chem.* 256: 10664-10670.

- TADANO, T., OZAWA, K., SAKAI, H., OSAKI, M. & MATSUI, H. (1993) - **Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots**, *Plant and Soil*, 95: 95-98.
- TANIZAKI, M. M., BITTENCOURT, H. M. S. & CHAIMOVICH, H. (1977) - **Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 485: 116-123.
- THEODOROU, M. E. & PLAXTON, W. C. (1993) - **Metabolic adaptations of respiration to nutritional phosphate deprivation**, *Plant Physiol.*, 101: 339-344.
- TREWAVAS, A. (1976) - **Post-translational modification of proteins by phosphorylation**, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 27:349-374.
- UEHARA, K., FUJIMOTO, S. & TANIGUCHI, T. (1974) - **Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato: Purification and some physical properties**, *J. Biochem.*, 75:627-638.
- UEKI, K. & SATO, S. (1977) - **Regulation of phosphatase synthesis by orthophosphate in cultured tobacco cells**, *Plant Cell Physiol.*, 18: 1253-1263.
- ULLAH, A.H.J. & GIBSON D.M (1988) - **Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260:514-520.

- VINCENT, J. B., CROWDER, M. W. & AVERILL B. A. (1992) - **Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions**, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 105-110.
- YAMAGATA, H., TANAKA, K. & KASAI, Z. (1980) - **Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains**, *Plant & Cell Physiol.*, 21: 1449-1460.
- YANG, C.-M., DANKO, S.J. & MARKWELL, J.P. (1987) - **Thylakoid acid phosphatase and protein phosphatase activities in wheat (*Triticum aestivum* L.)** *Plant. Sci.*, 48:17-22.
- YUPSANIS, T., ELEFThERIOU, P., PANTAZAKI, A. & GEORGATSOS J. G. (1993) - **Multiplicity of metal-independent protein phosphatases of germinated alfafa seeds**, *J. Plant Physiol.*, 141:257-262.
- ZHANG, Z. Y. & VAN ETten, R. L. (1990) - **Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase - a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 282: 39-49.
- ZHAO, Z., TAN, Z., DILTz, C., YOU, M. and FISCHER, H. (1996) - **Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases**, *J. Biol. Chem.*, 271: 22251-22255.

PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DA TESE

FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. and AOYAMA, H.
(1998b) – **Soybean seed acid phosphatases: Unusual optimum temperature and thermal stability studies**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242: 282-286.

Soybean Seed Acid Phosphatases: Unusual Optimum Temperature and Thermal Stability Studies

Carmen Verissima Ferreira,* Jose Mauro Granjeiro,* Eulazio Mikio Taga,† and Hiroshi Aoyama*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil; and †Departamento de Bioquímica, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 17043-101 Bauru, São Paulo, Brazil

Received November 21, 1997

In contrast to other acid phosphatases, four cytoplasmic isoforms (AP1, AP2, AP3A and AP3B) purified from mature soybean seeds presented high activities at temperatures above 80°C, when p-nitrophenylphosphate (p-NPP) was utilized as substrate. However, with tyrosine phosphate and inorganic pyrophosphate as substrates, maximum activities were observed at temperature of 60°C during 10 min reaction. In the absence of substrate, enzymes lost only 20% activity after 60 min at 60°C; the isoforms AP3A and AP3B retained 30% of activity at 70°C after 60 min and all the isoforms were inactivated at 80°C, after 5 min. Thermal inactivation studies indicated that the soybean enzymes showed different temperature dependences in relation to most plant acid phosphatases. A best protective effect was observed when the isoforms were preincubated, at 70°C, with phosphate (10 mM) and p-nitrophenol (10 mM) which indicates that the enzyme inactivation was prevented only in the presence of both reaction products. © 1998 Academic Press

Acid phosphatases (E.C. 3.1.3.2) are a group of enzymes which catalyze the hydrolysis of phosphate monoesters with a pH optimum below 6.0. The enzymes are widely distributed in mammalian body fluids and tissues, plants and microorganisms. In particular, plant acid phosphatases have been characterized in roots (1), tubers (2), seeds (3), aleurone layer of barley (4), leaves (5) and maize scutellum (6). Particulate and soluble plant acid phosphatases are widely distributed and frequently occur in multiple forms which differ in molecular weight, substrate specificity and electrophoretic mobility. Many roles have been postulated for these enzymes in plants, including a role in the release of inorganic phosphate from organic phosphate in the environment. Phosphorus not only plays a vital role in energy transfer and in metabolic regulation but is also an important constituent of macromolecules such as

phospholipids, proteins and nucleic acids. The growth and development of plants are particularly dependent upon the availability of phosphate, under conditions of phosphate limitation (7). However, despite the description of purification and characterization of several plant acid phosphatases, the physiological substrate(s) and kinetic mechanism are not yet well established.

Little work has been done on the stability of acid phosphatases. The purpose of this work is to examine the effect of the temperature on the activities of the four forms of acid phosphatases (AP1, AP2, AP3A and AP3B) purified from mature soybean seeds. Studies of thermal inactivation of the four enzymatic forms, in the absence and in the presence of some compounds, is also described.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The soybean seed acid phosphatase isoforms AP1, AP2, AP3A and AP3B were purified 910-, 180-, 15- and 73-fold, with specific activities of 49.5, 9.8, 0.8 and 4.0 Units/mg of protein, respectively (8).

Enzymatic assays. The 1 mL reaction mixture contained 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 10 mM p-nitrophenylphosphate (p-NPP) and the enzyme. After 10 min incubation, at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 1 mL 1 M NaOH. Acid phosphatase activity was measured at 405 nm by monitoring the release of p-nitrophenol (p-NP), using a molar extinction coefficient of 18,000 M⁻¹cm⁻¹.

When tyrosine phosphate (Tyr-P) and inorganic pyrophosphate (PPi) were used as substrates, the enzyme activity was assayed by measuring the amount of phosphate released according to the method of Lowry and Lopez (9). Inorganic phosphate was determined at pH 4.0, using ascorbic acid as reductor and a molar extinction coefficient of 4,000 M⁻¹cm⁻¹.

One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the hydrolysis of one μ mol p-NPP, or the formation of one μ mol inorganic phosphate, per minute.

Thermal stability of acid phosphatases. Each enzymatic form (5.05, 40.8, 129 and 70 μ g of AP1, AP2, AP3A and AP3B, respectively) was preincubated with 100 mM acetate buffer, pH 5.0, at 60 °C, 70 °C and 80 °C for different intervals of time.

In the enzyme thermal stability studies, the fractions were preincubated at 70 °C in the absence and in the presence of different compounds.

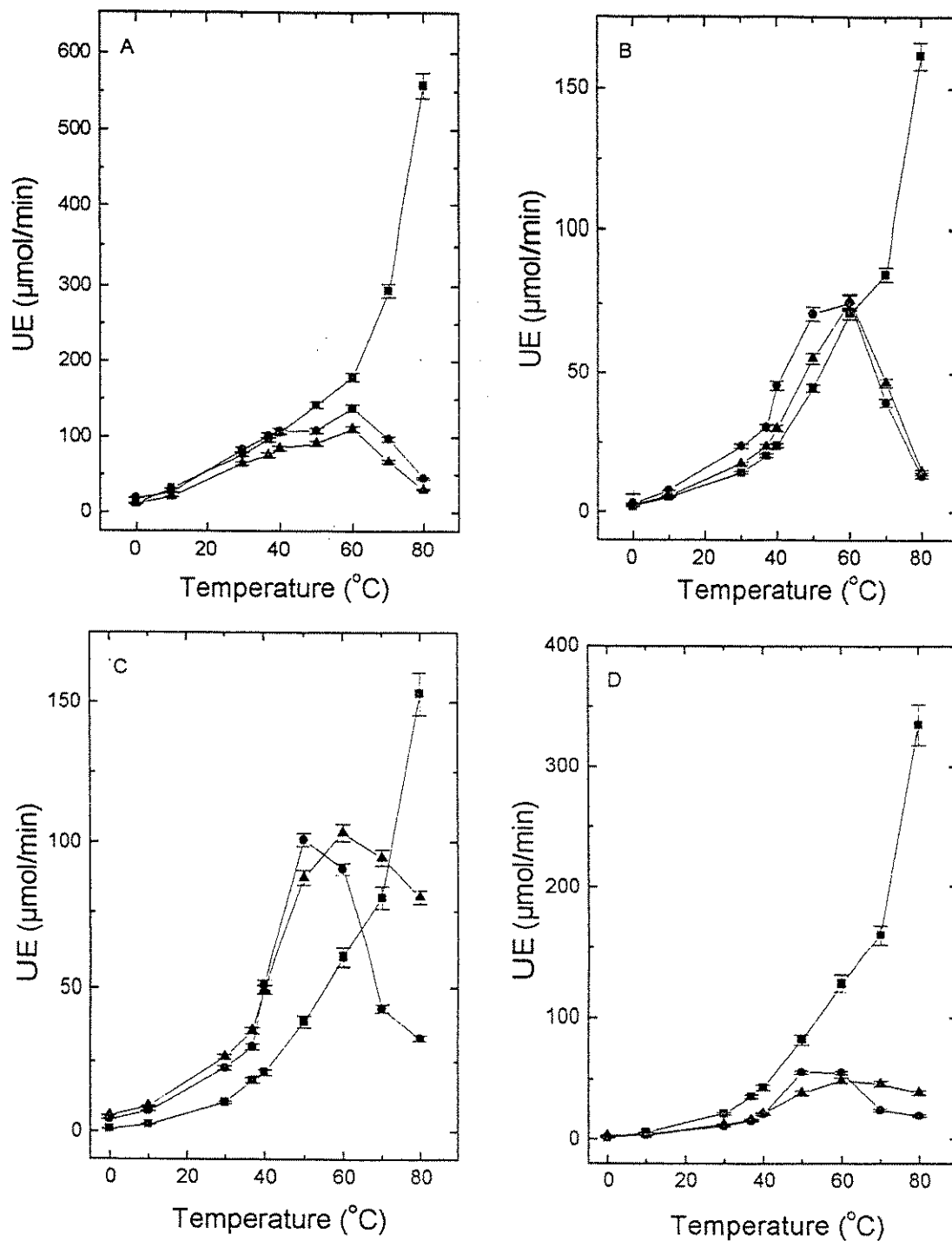


FIG. 1. Effect of temperature on the activity of soybean seed acid phosphatases. The assay conditions were the same as described in Materials and Methods for the enzymatic forms AP1 (A), AP2 (B), AP3A (C) and AP3B (D), using PPI (●), Tyr-P (▲) or pNPP (■) as substrate. The experiments were performed in triplicates and bars represent the standard deviations.

In all cases, the remaining enzyme activity was assayed with p-NPP as substrate at 37 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

The four isoforms of soybean seeds acid phosphatases presented high activities, even at temperatures above 80°C (Figure 1), which are higher than those described

for other plant acid phosphatases such as barley roots (30-35°C) (1), cotton seed (37°C) (10), yam (50°C) (11) and cotyledons of germinating soybean seeds (60°C) (12,13), when p-NPP was utilized as substrate. On the other hand, lower optimum temperature values were obtained using other substrates. With tyrosine phosphate, the maximum activity was observed at 60 °C,

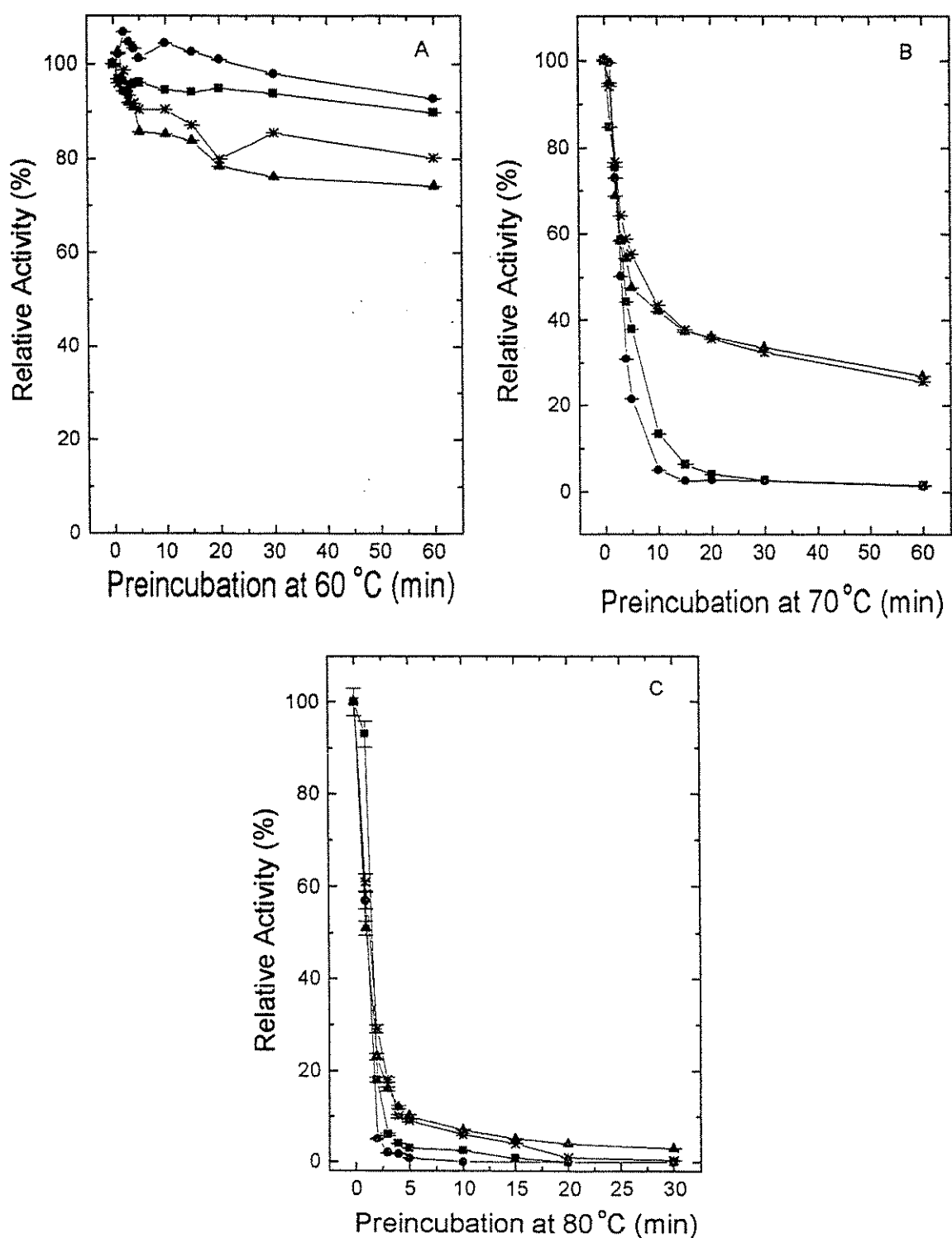


FIG. 2. Thermal stability studies of soybean seed acid phosphatases. The enzymes (2.5, 25.5, 80.6 and 43.7 $\mu\text{g/mL}$ of AP1 (●), AP2 (■), AP3A (▲) and AP3B (*), respectively) were incubated at 60 (A), 70 (B) or 80°C (C) in 100 mM acetate buffer, pH 5.0. After the indicated times, 20-25 μl aliquots of the incubation mixtures were withdrawn and the residual activity was measured using p-NPP as substrate. 100% activity correspond to the formation of 50, 19, 26 and 13 $\mu\text{moles/min}$ of p-nitrophenol by the enzymatic forms AP1, AP2, AP3A and AP3B, respectively. The experiments were performed in triplicates and bars represent the standard deviations.

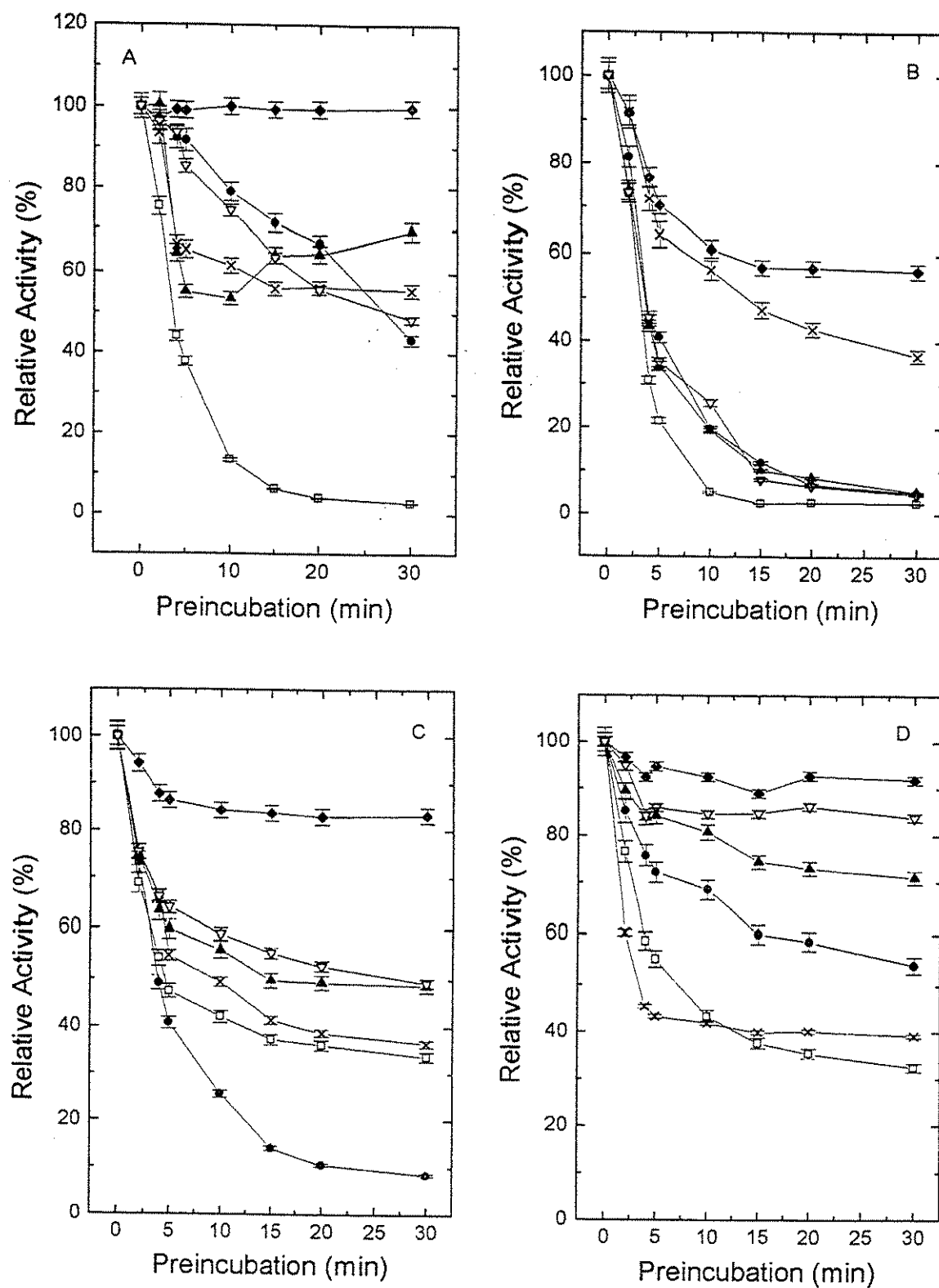


FIG. 3. Effect of different compounds in the preincubation at 70 °C of the four acid phosphatase isoforms. Preincubation of the enzymatic forms AP1(A), AP2(B), AP3A(C) and AP3B(D) was carried out in the absence (□) and in the presence of 10 mM phosphate (▲), p-NP (▽), p-n-vanadate (×), triton x-100 (●) and phosphate + p-NP (◆) for the indicated times and the activity was assayed with p-NPP as substrate. 100% activity corresponds to the formation of 50, 19, 26 and 13 μ moles/min of p-nitrophenol by the enzymatic forms AP1, AP2, AP3A and AP3B, respectively. The experiments were performed in triplicates and bars represent the standard deviations.

and when PPI was used as substrate, the optimum temperature values were 60 °C (AP1, AP2 and AP3B) and 50 °C (AP3A) (Figure 1). Our results suggest that the unusual high optimum temperature with pNPP as substrate is not due to the stability of the enzyme, since this behaviour was not maintained with other substrates.

In order to investigate the thermal stability of the four acid phosphatases, we performed preincubation studies of these forms in the absence of substrate. The four isoforms lost only 20% activity at 60°C after 60 min; the isoforms AP3A and AP3B retained 30% of activity at 70°C after 60 min; all the isoforms were inactivated at 80°C after 5 min (Figure 2).

In contrast to other plant acid phosphatases, all the enzymatic isoforms of soybean seeds presented high thermal stability at 60°C; at this temperature other acid phosphatases show significant loss of activity (2, 14).

In order to verify whether the enzymatic forms could be protected against thermal inactivation, we tested some compounds with different characteristics. Phosphate and p-NP are products of enzyme reaction; phosphate and m-vanadate are competitive inhibitors of the four enzymatic isoforms; triton X-100 can activate some reactions catalyzed by acid phosphatases. Phosphate (10 mM), p-NP and triton X-100 prevented thermal inactivation of the AP1 and AP3B isoforms. A protective effect against the thermal inactivation was observed when m-vanadate was utilized, however, this effect occurred only for the AP1 and AP2 isoforms. Among the compounds tested, the best protective effect was observed when the isoforms were preincubated, at 70°C, with phosphate (10 mM) and p-nitrophenol (10 mM) (Figure 3).

The similar thermal behaviour for the four phosphatases forms suggests that these enzymes may be constituted by a similar type of protein. Our results also suggest that the high activities at 80°C could be due to the stabilization of the enzymes in the presence of both reaction products, p-nitrophenol and inorganic phos-

phate. Other reaction products when utilized together in the medium, e. g. tyrosine and inorganic phosphate did not present this protective effect (not shown). These results could explain the lower enzyme activities at high temperatures with tyrosine phosphate as substrate when compared with pNPP.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa/Unicamp, and CAPES postgraduate scholarships to CVF and to JMG (PICD). The authors are grateful to Dr. Fred Y. Fujiwara (Instituto de Química, Unicamp) for critically reading the manuscript.

REFERENCES

1. Panara, F., Pasqualini, S., and Antonielli, M., (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1037**, 73–80.
2. Gellatly, K., Moorhead, G. B. G., Duff, S. M. G., Lefebvre, D. D., and Plaxton, W. C. (1994) *Plant Physiol.* **106**, 223–232.
3. Park, H. S. C., and Van Etten, R. L. (1986) *Phytochemistry*, **25**, 351–357.
4. Gabard, K. A., and Jones, R. L. (1986) *Physiol. Plant.* **67**, 182–192.
5. Staswick, P. E., Papa, C., Huang, J., and Rhee, Y. (1994) *Plant Physiol.*, **104**, 49–57.
6. Rossi, A., Palma, M. S., Leone, F. A., and Brigliador, M. A. (1981) *Phytochemistry* **20**, 1823–1826.
7. Lefebvre, D. D., Duff, S. M. G., Fife, C., and Plaxton, W. C. (1990) *Plant Physiol.* **93**, 504–511.
8. Ferreira, C. V., Taga, E. M., and Aoyama, H. (1997) *Plant Biochemistry and Physiology*, submitted.
9. Lowry, O. H., and Lopez, J. A. (1945) *J. Biol. Chem.* **162**, 421–424.
10. Bhargava, R., and Sachar, R. C. (1987) *Phytochemistry* **26**, 1293–1297.
11. Kamenan, A., and Diopoh, J. (1982) *Plant Sci. Letters* **24**, 173–
12. Ullah, A. H. J., and Gibson, D. M. (1988) *Arch. Biochem. Biophys* **260**, 514–520.
13. De-Kundu, P., and Banerjee, A. C. (1990) *Phytochemistry* **29**, 2825–2828.
14. Ueki, K., and Sato, S. (1977) *Plant Cell Physiol.* **18**, 1253–1263.

FERREIRA, C.V., TAGA, E.M. and AOYAMA, H. (1998). **Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms.** *Plant Science*, aceito para publicação.

Title: GLYCOLYTIC INTERMEDIATES AS SUBSTRATES OF
SOYBEAN ACID PHOSPHATASE ISOFORMS

Authors: Carmen V. Ferreira ^{1,a}, Eulazio M. Taga ^b and Hiroshi Aoyama ^{a,*}

Institution: ^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas,
São Paulo, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica, Faculdade de Odontologia de
Bauru, Universidade de São Paulo, 17043-101 Bauru, São
Paulo, Brasil.

Correspondence to: Dr. Hiroshi Aoyama

Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia
Cidade Universitária
13083-970 CAMPINAS - Sao Paulo
BRASIL

Fax: 55-19-289-3124

Email: aoyama@obelix.unicamp.br

* Corresponding author

¹ Present address: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências,
UFRN, 59078-000 Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Running title: Soybean seed acid phosphatases and glycolysis

Keywords : *Glycine max*, Soybean seed, Acid phosphatase, Kinetics,
Glycolytic intermediates hydrolysis.

Abstract

The kinetic properties of four isoforms of acid phosphatase purified from mature soybean (*Glycine max*) seeds were studied using glycolytic metabolites as substrates. The isoforms AP1, AP3A and AP3B presented maximal activities around pH 4.0, and AP2 at pH 6.0, for phosphoenolpyruvate (PEP) as a substrate. With glucose-6-P (G6P) and fructose-6-P (F6P) maximal activities were observed at pH 5.5 for the AP3A and AP3B isoforms. The acid phosphatases presented the following apparent K_m values, determined for p-nitrophenylphosphate (pNPP), PEP, G6P and F6P as substrates, at the corresponding optimum pH values: AP1 (pNPP: 0.49, PEP: 0.23 mM); AP2 (pNPP: 0.38, PEP: 0.47 mM); AP3A (pNPP: 0.20, PEP: 0.10, G6P: 0.30, F6P: 0.16 mM) and AP3B (pNPP: 0.086, PEP: 0.078, G6P: 0.31, F6P: 0.33 mM). The isoforms AP1 and AP3A exhibited the highest specificity constant (V_{max}/K_m) values, 387 and 350, respectively, when compared with other substrates. Independent of the substrates, the reactions catalyzed by the soybean acid phosphatase isoforms were strongly inhibited by molybdate and to a lesser extent by Zn^{2+} . Inhibitions were also observed in the presence of fluoride, with PEP as a substrate, and by Cu^{2+} , and pCMB with G6P and F6P as substrates. Our results suggest that the four acid phosphatase forms could play important roles in plant metabolism, acting on key glycolytic intermediates.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; FMN, flavine mononucleotide; pCMB, *p*-chloromercuribenzoate; F6P, fructose-6-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenol-pyruvate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; pNPP, *p*-nitrophenylphosphate; SDS, sodium dodecylsulfate.

1. Introduction

Acid phosphatases (E.C. 3.1.3.2) are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of phosphate monoesters. These enzymes are widely distributed in mammalian body fluids and tissues, plants and microorganisms. In particular, plant acid phosphatases have been characterized in roots [1], tubers [2], bulb [3], seed [4-6], aleurone layer [7], leaves [8], maize scutellum [9] and suspension cells [10,11]. These phosphatases, usually present in multiple forms, display different biochemical properties and exhibit a broad specificity at pH optima below 6.0. Many roles have been ascribed to these enzymes in plants, including the releasing of inorganic phosphate in the environment [12]. Phosphorus not only plays a vital role in energy transfer and in metabolic regulation, but is also an important macromolecular constituent such as in phospholipids, proteins and nucleic acids. The growth and development of plants are particularly dependent upon the availability of phosphate, under conditions of phosphate limitation [10].

There are some special classes of acid phosphatases displaying a clear, but nonabsolute substrate specificity. For example plant 3-PGA phosphatase [13] and phytase [5] preferentially utilize as substrates 3-PGA and phytic acid, respectively. However, both phosphatases also hydrolyze a variety of other phosphorylated substrates.

In this context, PEP, a key intermediate of plant glycolysis, has been demonstrated to be one of the best substrates for a number of purified plant acid phosphatases. Duff et al [11] purified a vacuolar acid phosphatase from

Brassica nigra suspension cells that presented at least a five-fold and six-fold greater affinity and specificity constant, respectively, for PEP than for any other nonartificial substrate. Although its substrate specificity was not absolute, this enzyme was designated as a PEP phosphatase. These authors [14] also purified from *B. nigra* a secreted, cell wall localized acid phosphatase, designated phosphatase A, distinct from the PEP phosphatase (phosphatase B), which hydrolyzed a wide variety of phosphate esters, with similar efficiency.

However, there are only few references on detailed kinetic studies with different isoforms of the same tissue using PEP or other glycolytic intermediates as substrates. In this paper we describe the kinetic characterization of four distinct acid phosphatases purified from mature soybean seed, using some glycolytic phosphorylated metabolites as substrates.

2. Materials

Plant materials. Soybean seed acid phosphatases (AP1, AP2, AP3A and AP3B) were purified 910-, 180-, 15- and 73-fold, with specific activities of 50, 10, 0.8 and 4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein, as previously described [16]. pNPP, PEP and other phosphomonoester compounds were purchased from Sigma Chemical Company. All other chemicals were of the highest purity available.

3. Methods

Enzyme Assay.

The reaction mixture (1 ml) contained 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 5 mM pNPP, and enzyme. After 10 min of incubation at 37°C, the reaction was stopped by addition of 1 ml of 1 M NaOH and the absorbance was read at 405 nm. The molar extinction coefficient of p-nitrophenolate ion, at 405 nm, in alkaline medium is 18,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

When other substrates were used, the enzyme activity was assayed by measuring the amount of phosphate released. In a volume of 1 ml, the reaction mixture contained 100 mM buffer at the optimum pH, 10 mM substrate and enzyme. After 10 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by addition of 1 ml of 3% ammonium molybdate (in 200 mM acetate buffer, pH 4.0), followed by addition of 0.1 ml of ascorbic acid (in 200 mM acetate buffer, pH 4.0). The color was developed for 30 min and the absorbance was read at 700 nm. The amount of inorganic phosphate produced was calculated using a molar extinction coefficient of 4,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [15].

4. Results and Discussion

Glycolysis is a complex network containing alternative enzymatic reactions. The kinetic study of acid phosphatases is very important in order to elucidate the cellular roles of these enzymes in the glycolytic process. The present report describes some properties of acid phosphatases purified from mature soybean seed using G6P, F6P and PEP as substrates. Although there are several reports on acid phosphatases from plant tissues [3, 12], little information is available on the characterization of purified seed phosphatases with substrates other than the nonphysiological *p*-nitrophenylphosphate.

The four isoforms showed maximum activities towards the synthetic substrate pNPP, however considerable activity was also observed with PEP, glucose 6-P, fructose 6-P, and fructose 1,6 di-P, to an extent that depended on the enzyme isoforms (Table 1). Among the four forms, AP3A and AP3B presented the highest activities towards all the substrates tested, with PEP hydrolyses (about 100%) comparable to those obtained for pNPP. In all the cases, the assays were performed accounting for the initial rates, where the plots were linear with respect to time and enzyme concentration. The soybean seed acid phosphatases did not hydrolyze phytic acid, indicating that our preparation was free from phytase (data not shown).

These results are consistent with the report that plant acid phosphatases could catalyze the dephosphorylation of a variety phosphomonoesters [14].

The pH optimum study, for the PEP hydrolysis, showed that AP1, AP3A and AP3B presented maximal activities around pH 5.5, and AP2 at pH 7.0 (Fig. 1). However, using pNPP as substrate [16], the pH study showed that

the four forms of soybean seed acid phosphatase presented the same range of pH optimum. With PEP as substrate, the phosphatases from black mustard [11] and from germinating mung beans [6] showed pH optimum of 5.6 and 8.5, respectively. The pH dependence of the enzyme activity may be an important aspect of the fine control of plant metabolism.

The kinetic studies using G6P and F6P as substrates were performed with the isoforms AP3A and AP3B that showed the highest activities with these glycolytic intermediates (Table 1).

The optimum pH on the reaction catalyzed by the two isoforms were 5.5 for G6P and F6P, with significant activity in the interval from pH 4.0 to 7.0 (Fig. 2).

Table 2 lists the $V_{\max}$ and K_m values, as calculated from Lineweaver-Burk plots, along with specificity constants ($V_{\max}/K_m$) for pNPP and PEP. AP1, AP3A and AP3B have shown the highest specificity constants for PEP (387, 350 and 205, respectively). The forms AP3A and AP3B presented apparent K_m values for hydrolysis of pNPP and PEP smaller than those obtained for AP1 and AP2. The K_m values for PEP of the isoforms AP1 and AP2 were of the same order of magnitude when compared with the mung bean phosphatase [6], whereas the values for AP3A and AP3B were more comparable to that described for the enzyme purified from black mustard [11]. The enzyme that hydrolyzed PEP at pH 8.5 did not recognize pNPP as substrate [6]. The acid phosphatase purified from onion bulbs showed the lowest K_m with PEP, and the highest specificity constant with ATP [3]. The lowest K_m and the highest specificity constant values for the black mustard

enzyme were observed for PEP [11]. PEP was also the best substrate for two of the six acid phosphatase isozymes of wheat germ [17].

The specificity constant values for the two isoforms AP3A and AP3B were smaller for the substrates G6P and F6P when compared with PEP and pNPP (Table 2). The acid phosphatase purified from maize seeds [9] hydrolyzed G6P with an efficiency of about 70% in relation to pNPP. Mung beans [6] PEP phosphatase did not recognize glycolytic intermediates as substrates, while the enzyme from *B. nigra* [11] hydrolyzed G1P (80%), 3-PGA (67%), G6P (21%) and 2-PGA (10%). On the other hand, acid phosphatase A purified from *B. nigra* [14] was able to hydrolyze some sugar phosphates, but not G6P and F6P.

Differential inhibitions were observed for the soybean seed acid phosphatases when pNPP and PEP were used as substrates. In order to determine the effect of some metal ions as possible activators or inhibitors of acid phosphatases, the isoforms were incubated with these compounds and then the activity was determined (Table 3). The phosphatase isoforms were inhibited about 50% by 1 mM Zn^{2+} ; under the same conditions 1 mM Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} had little or no effect. The four isoforms were weakly inhibited by Cu^{2+} , in contrast to that observed in the presence of pNPP [16]. The PEP phosphatases purified from mung beans [6] and black mustard [11] were both inhibited by Zn^{2+} and Cu^{2+} , and activated by Mg^{2+} . In contrast, our studies showed that all the four soybean seed acid phosphatase isoforms were not affected by Mg^{2+} , and only weakly inhibited by Cu^{2+} , except for AP3B with 50% inhibition.

With the exception of Cu^{2+} that inhibited about 50% of the AP3A and AP3B activities in the presence of G6P and F6P (Table 4), the effects of the other metal ions tested were similar to those described for PEP (Table 3) and pNPP [16].

Different compounds were tested as possible effectors of soybean seed acid phosphatase isoforms. The acid phosphatases were inhibited by molybdate and fluoride, and to a lesser extent by glycerol and ethanol; SDS had no effect (Table 5). Molybdate and fluoride are strong plant pNPP-directed acid phosphatase inhibitors, inhibiting also the black mustard PEP phosphatase [11].

Table 6 shows the effect of several compounds on the activities of AP3A and AP3B with G6P and F6P as substrates. The isoforms AP3A and AP3B were activated by triton X-100 and by BSA, and inhibited by pCMB, in contrast to the observations with PEP (Table 5) and pNPP [16] as substrates. Enzyme inhibitions by Cu^{2+} and pCMB can indicate the presence of essential SH groups for catalysis. In the case of the four soybean acid phosphatase isoforms, which do not contain SH residues in the active site [16], the effects of Cu^{2+} and pCMB were dependent on the substrates used. Guanosine activated the reactions catalyzed by these isoforms in the presence of F6P as substrate. Guanosine and glycerol have been related to activate mammal low molecular mass acid phosphatases [18].

Another factor that differentiates the soybean seed phosphatases from the corresponding enzymes purified from *B. nigra* [11] and mung bean [6] concerns the effect of temperature. The soybean enzymes were more thermostable, showing optimum temperatures around 60 °C [19]. Despite

the highest PEP hydrolysis in relation to other substrates, both *B. nigra* [11] and mung bean [6] enzymes displayed very significant differences.

Our results suggest that the soybean seed AP3A and AP3B acid phosphatases isoforms may play important roles in the metabolism of carbohydrate in plants, hydrolyzing PEP, G6P, F6P and F1,6diP. The isoforms AP1 and AP2 also participate in the hydrolysis of PEP, and the other phosphate sugars, but at a lesser extent when compared with the activities of AP3A and AP3B.

The function of a PEP-phosphatase in the cellular economy is not clear. Recently, it has been suggested that this enzyme could provide an alternative route from PEP to pyruvate [20]. This deviation may become significant under conditions of phosphate starvation or other stress conditions. It is worthwhile mentioning that a fine control of enzymes involved in the metabolism of fructose-6-phosphate and PEP can contribute to the regulation of plant glycolytic flux.

Acknowledgements. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 1997/6360-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc.521654/95-5), Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa/Unicamp, and FAPESP postgraduate scholarship to CVF. The authors are grateful to Dr. Ladaslav Sodek (Instituto de Biologia, Unicamp) for critically reading the manuscript.

Legends to the Figures

Fig.1. Effect of pH on the activity of soybean seed acid phosphatases with PEP as a substrate. The enzymatic activities of the forms AP1 (○), AP2 (□), AP3A (■) and AP3B (●) were determined using 10 mM PEP as substrate, in the presence of 100 mM of the following buffers: Glycine (pH 2.5 and 3.0 and 9.0), Acetate (pH 4.0-5.5), Bis-Tris (pH 6.0), Imidazole (pH 7.0 and 8.0). The experiment was performed in triplicate and bars represent the standard deviations.

Fig.2. Effect of pH on the activity of soybean seed acid phosphatases with glucose-6-P or fructose-6-P as a substrate. The enzymatic activities of the forms AP3A (○), AP3B (□) were determined using 10 mM glucose-6-P (open symbols) or fructose-6-P (closed symbols) as a substrate, in the presence of 100 mM of the following buffers: Glycine (pH 2.5 and 3.0 and 9.0), Acetate (pH 4.0-5.5), Bis-Tris (pH 6.0), and Imidazole (pH 7.0 and 8.0). The experiment was performed in triplicate and bars represent the standard deviations.

Table 1

Substrate specificity of the soybean seed acid phosphatase isoforms.

Substrate	Activity (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
pNPP	100	100	100	100
Phosphoenolpyruvate	78 (± 5)	78(± 3)	96(± 5)	97(± 3)
Glucose 6-P	28(± 1)	6(± 1)	77(± 1)	68(± 2)
Fructose 6-P	35(± 2)	14(± 2)	49(± 2)	69(± 1)
Fructose 1,6 di-P	31(± 1)	22(± 1)	58(± 3)	62(± 4)

100 mM acetate buffer (pH 5.0), 5 mM pNPP or 10 mM of the other substrates and enzyme were incubated as described in Materials and Methods. The controls contained the corresponding substrate in order to account for the possible contaminant Pi. All the data were obtained in triplicate and shown with their standard deviations (in parentheses).

Table 2

Kinetic parameters of the soybean seed acid phosphatase isoforms.

Isoform	Substrate	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	K_m (mM)	$V_{\max}/K_m$
AP1	pNPP	114 (± 4)	0.49 (± 0.020)	233 (± 3)
	PEP	89 (± 5)	0.23 (± 0.010)	387 (± 5)
AP2	pNPP	22 (± 1)	0.38 (± 0.020)	58 (± 2)
	PEP	17 (± 3)	0.47 (± 0.017)	36 (± 4)
AP3A	pNPP	37 (± 2)	0.20 (± 0.017)	185 (± 3)
	PEP	35 (± 3)	0.10 (± 0.010)	350 (± 4)
	G6P	30 (± 3)	0.30 (± 0.028)	100 (± 4)
	F6P	18 (± 3)	0.16 (± 0.031)	112 (± 4)
AP3B	pNPP	16 (± 3)	0.086 (± 0.004)	186 (± 5)
	PEP	16 (± 2)	0.078 (± 0.007)	205 (± 6)
	G6P	11 (± 2)	0.31 (± 0.027)	35 (± 2)
	F6P	11 (± 2)	0.33 (± 0.045)	33 (± 3)

The assay conditions were the same as described in Material and Methods.

K_m and $V_{\max}$ values were calculated from Lineweaver-Burk plots. All the data were obtained in triplicate and shown with their standard deviations (in parentheses).

Table 3

Effect of metal ions on the soybean seed acid phosphatases with phosphoenolpyruvate as a substrate.

Metal Ion	Relative Activity (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
Mn ²⁺	103(±2)	66(±5)	79(±4)	82(±4)
Cu ²⁺	89(±2)	112(±2)	70(±3)	53(±2)
Ca ²⁺	97(±2)	103(±2)	80(±2)	96(±1)
Mg ²⁺	105(±5)	102(±3)	103(±2)	100(±4)
Zn ²⁺	46(±4)	59(±2)	47(±3)	68(±3)

The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, with 10 mM PEP as a substrate in the presence of 1 mM metal ion. In the absence of metal ion the activities were considered as 100 % (35, 4, 2, 1.8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of Pi released for AP1, AP2, AP3A and AP3B, respectively). All data were obtained in triplicate and shown with their standard deviations. (in parentheses)

Table 4

Effect of metal ions on the soybean seed acid phosphatases with glucose-6-P or fructose-6-P as a substrate.

Metal ion	Relative Activity (%)			
	AP3A		AP3B	
	G6P	F6P	G6P	F6P
Mn ²⁺	96	79	96	76
Cu ²⁺	35	36	46	49
Ca ²⁺	80	70	79	96
Mg ²⁺	102	100	105	110
Zn ²⁺	34	47	42	68

The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, with 10 mM G6P or F6P as a substrate in the presence of 1 mM metal ion. In the absence of metal ion the activities were considered as 100 % (G6P – 0.9, F6P – 0.56; G6P – 1.3, F6P – 1.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of Pi released for AP3A and AP3B, respectively). The data were obtained in duplicate and the SD values were lower than 5% in all the cases.

Table 5

Effect of different compounds on the soybean seed acid phosphatase activities with phosphoenolpyruvate as a substrate.

Compound	Relative Activity (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
pCMB 100 μ M	62($\pm$ 4)	98($\pm$ 3)	54($\pm$ 2)	57($\pm$ 4)
Molybdate 100 μ M	2($\pm$ 1)	4($\pm$ 2)	6($\pm$ 1)	7($\pm$ 3)
Tartrate 5 mM	87($\pm$ 3)	101($\pm$ 4)	102($\pm$ 5)	101($\pm$ 4)
Fluoride 5 mM	61($\pm$ 2)	15($\pm$ 2)	14($\pm$ 4)	22($\pm$ 3)
Guanosine 1 mM	92($\pm$ 3)	102($\pm$ 2)	94($\pm$ 3)	105($\pm$ 2)
Ethanol 10%	78($\pm$ 3)	85($\pm$ 5)	81($\pm$ 2)	90($\pm$ 4)
Glycerol 2 M	58($\pm$ 4)	57($\pm$ 4)	74($\pm$ 4)	75($\pm$ 5)
BSA 0.1 mg/mL	104($\pm$ 5)	116($\pm$ 3)	97($\pm$ 5)	106($\pm$ 4)
SDS 0.05%	81($\pm$ 2)	108($\pm$ 1)	90($\pm$ 3)	96($\pm$ 4)
Triton X-100 0.2%	104($\pm$ 5)	105($\pm$ 2)	99($\pm$ 4)	110($\pm$ 2)

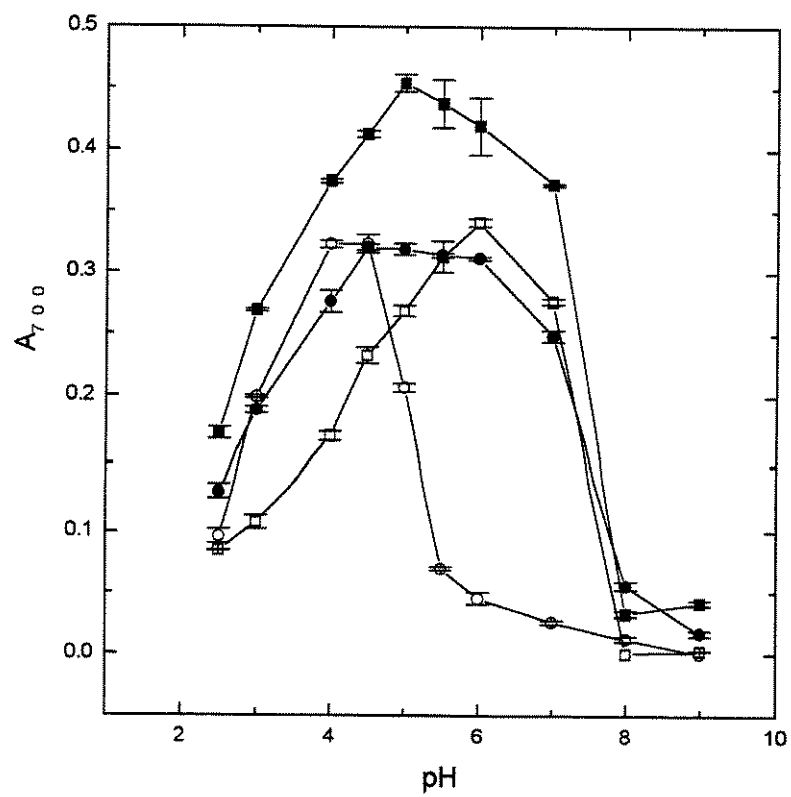
The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, with 10 mM PEP as a substrate in the presence of the indicated concentrations of compounds. In the absence of inhibitors the activities were considered as 100 % (35, 4, 2, 1.8 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ of Pi released for AP1, AP2, AP3A and AP3B, respectively). All data were obtained in triplicate and shown with their standard deviations (in parentheses).

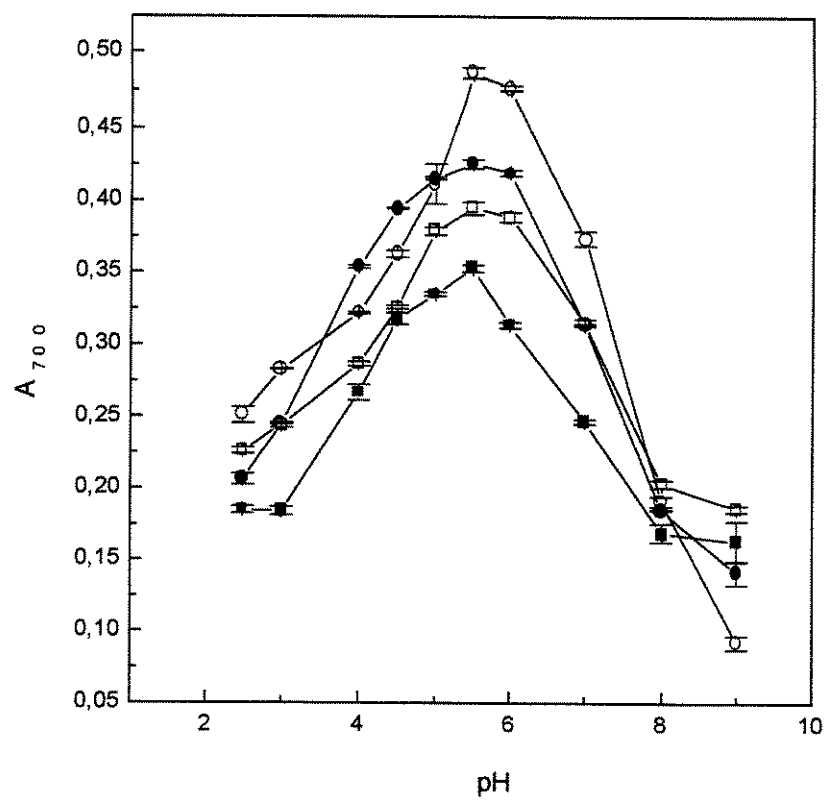
Table 6

Effect of different compounds on the soybean seed acid phosphatase activities with glucose-6-P or fructose-6-P as a substrate.

Compound	Relative Activity (%)			
	AP3A		AP3B	
	G6P	F6P	G6P	F6P
pCMB 100 μ M	6	19	5	9
Molybdate 100 μ M	7	10	8	14
Tartrate 5 mM	107	112	106	123
Fluoride 5 mM	81	95	82	98
Guanosine 1 mM	98	122	102	130
Ethanol 10%	70	80	61	52
Glycerol 2 M	56	55	88	68
BSA 0.1 mg/mL	113	126	110	137
SDS 0.05%	68	64	52	55
Triton X-100 0.2%	150	131	109	140

The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, with 10 mM G6P or F6P as a substrate in the presence of the indicated concentrations of compounds. In the absence of inhibitors the activities were considered as 100 % (G6P – 0.9, F6P – 0.56; G6P – 1.3, F6P – 1.1 μ mol mg^{-1} of Pi released for AP3A and AP3B, respectively). The data were obtained in duplicate and the SD values were lower than 5% in all the cases.





References

- [1] A.R. Penheiter, S.M. Duff, G. Sarath, Soybean root nodule acid phosphatase, *Plant Physiol.* 114 (1997) 597-604.
- [2] K. Gellatly, G.B.G. Moorhead, S.M.G. Duff, D.D. Lefebvre, W.C. Plaxton, Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase, *Plant Physiol.* 106 (1994) 223.
- [3] J. Guo, T.C. Pesacreta, Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. var. sweet spanish, *J. Plant Physiol.* 151 (1997) 520-527.
- [4] H.S.C. Park, R.L. Van Etten, Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase, *Phytochemistry* 25 (1986) 351-357.
- [5] D.M. Gibson, A.H. Ullah, Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds, *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (1988) 503-513.
- [6] O.P. Malhotra, A.M. Kayastha, Isolation and characterization of phosphoenolpyruvate phosphatase from germinating mung beans (*Vigna radiata*), *Plant Physiol.* 93 (1990) 194-200.
- [7] K.A. Gabard, R.L. Jones, Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley, *Physiol. Plantarum* 67 (1986) 182-192.
- [8] P.E. Staswick, C. Papa, J. Huang, Y. Rhee, Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal, *Plant Physiol.* 104 (1994) 49-57.
- [9] A. Rossi, M.S. Palma, F.A. Leone, M.A. Brigliador, Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds, *Phytochemistry* 20 (1981) 1823-1826.

- [10] D.D. Lefebvre, S.M.G. Duff, C. Fife, W.C. Plaxton, Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate, *Plant Physiol.* 93 (1990) 504-511.
- [11] S.M.G. Duff, D.D. Lefebvre, W.C. Plaxton, Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells, *Plant Physiol.* 90 (1989) 734-741.
- [12] S.M.G. Duff, G. Sarath, W.C. Plaxton, The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism, *Physiol. Plantarum* 90 (1994) 791-800.
- [13] D.D. Randall, N.E. Tolbert, 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants I. Isolation and characterization from sugarcane leaves, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 5510-5517.
- [14] S.M.G. Duff, D.D. Lefebvre, W.C. Plaxton, Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase, *Arch. Biochem. Biophys.* 286 (1991) 226-232.
- [15] O.H. Lowry, J.A. Lopez, The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters, *J. Biol. Chem.* 162 (1945) 421-424.
- [16] C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro, E.M. Taga, H. Aoyama, Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases, *Plant Physiol. Biochem.* 36 (1998) 487-494.
- [17] Y. Kawarasaki, H. Nakano, T. Yamane, Purification and some properties of wheat germ acid phosphatases, *Plant Sci.* 119 (1996) 67-77.

- [18] M.M. Tanizaki, H.M.S. Bittencourt, H. Chaimovich, Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol, *Biochim. Biophys. Acta* 485 (1977) 116-123.
- [19] C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro, E.M. Taga, H. Aoyama, Soybean acid phosphatase: Unusual thermal stability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242 (1998) 282-286.
- [20] W.C. Plaxton, The organization and regulation of plant glycolysis, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 185-214.