#### DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

# PURIFICAÇÃO DE HEXOQUINASES DE RIM DE COELHO\*\*\*

(PURIFICATION OF HEXOKINASES FROM RABBIT KIDNEY)

JAIRA BELE DE FIGUEIREDO \* Instrutor de Ensino

ABADIA MOREIRA ABDO \* Instrutor de Ensino

METRY BACILA Prof. Catedrático

### INTRODUÇÃO

A primeira demonstração da existência de mecanismo capaz de formar açúcares fosforilados foi feita por Meyerhof (1) a partir de glicose e ATP incubados com autolisados de levedura. A partir de então, hexoquinases foram determinadas e estudadas em tecidos animais (2). Apesar, porém, da sua importância, tanto sob o ponto de vista de química de enzimas, como do ponto de vista de seu significado fisiológico, pouco se sabe sôbre a estrutura primária dessas proteínas.

Estudos de purificação e de cristalização de hexoquinases foram levados a efeito com sucesso apenas para a enzima de levedura por Kunitz e MacDonald (3) e por Bailey e Webb (4) e a sua dependência para grupos sulfidrílicos estabelecida. A existência de variedade de hexoquinases foi pela primeira vez estabelecida para a galactoquinase, encontrada por Caputto, Leloir e Trucco (5) em preparados de Saccharomyces fragilis e por Bacila (6) em fígado de rato. A dependência da galactoquinase de S. fragilis para grupos sulfidrílicos foi estabelecida por Bacila (7).

A complexidade do grupo das hexoquinases foi já revelada em trabalho anterior por Bacila e Barron (8). Verificou-se nessa ocasião que hormônios do grupo dos corticosteróides são capazes de inibir a glicólise anaeróbica de certos tecidos tais como diafragma isolado de camundongo ou de células isoladas como as células

<sup>\*</sup> Instituto Central de Biologia da Universidade de Brasília.

<sup>\*\*</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Ciências Médicas de

<sup>\*\*\*</sup> Trabalho realizado com auxílio do Projeto FUNTEC N.º 31, do Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico.

linfáticas do "apêndice do coelho"; corticosteróides não inibem, entretanto, a glicólise anaeróbica de linfócitos tumorais como os do linfosarcoma de Gardner. Foi verificado, ainda, que aquêles compostos são capazes de inibir a atividade hexoquinásica daqueles tecidos cuja glicólise anaeróbica é inibida pelos corticosteróides. Atividade hexoquinásica do linfo sarcoma de Gardner, de células do tumor ascítico de Ehrlich, bem como de hexoquinase de levedura não é, entretanto, inibida pelos corticosteróides.

Pesquisas sôbre hexoquinases de origem animal vêm sendo levadas a efeito neste laboratório (9, 10, 11), com a finalidade de estudar os seus aspectos cinéticos e estruturais, a fim de estabelecer possível correlação entre a estrutura dessas enzimas e a importante função que exercem no metabolismo celular. De início foi feita verificação preliminar da sua distribuição em vários tecidos animais. Rim de coelho foi utilizado, então, como material de escolha, considerando o fato de se ter verificado no mesmo atividade hexoquinásica para glicose, fructose, manose e galactose, bem como por ter sido, de todos os tecidos animais estudados, o que melhores perspectivas oferece para a purificação de galactoquinase.

Na etapa indicada, foi procedida, de início, verificação da ocorrência e da distribuição de enzimas do grupo das hexoquinases em diversos tecidos animais. É evidente que hexoquinase é enzima ancilar de distribuição por todos os sêres da natureza. Entretanto, o interesse da verificação empreendida se prendia ao fato da escolha de fonte de enzima que pudesse ser considerada como tendo particular interesse, dentro das características do trabalho que está sendo levado a efeito.

A partir da análise dos dados obtidos, a maior parte dos trabalhos que se seguiram foi em tôrno da purificação de quinases de rim de coelho, considerando-se o fato de que de todos os tecidos estudados foi o que apresentou melhor e mais nítida atividade da galactoquinase, fato que ocorreu, também, com o fígado de bovino.

Dentre as quinases, a galactoquinase (5, 6, 7) apresenta aspectos fundamentais dos mais interessantes, já pela própria natureza do mecanismo da sua ação enzimática.

Assim, trabalhos de purificação e de separação das diferentes quinases foram levados a efeito com rim de coelho, e o material obtido utilizado para a obtenção de vários dados preliminares a respeito do comportamento das quinases ali existentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Material biológico.

Preparações enzimáticas foram obtidas a partir de homogenizados de cérebro de bovino e de coelho, de intestino delgado de rato e de coelho, de rim de coelho, de fígado de bovino e de rato e de músculo cardíaco e de músculo estriado de rato.

## 2. Homogenados.

Os órgãos e tecidos foram prèviamente lavados em sôro fisiológico gelado e limpos, tanto quanto possível, de gordura e de tecido conjuntivo. Após essa etapa, foram cortados em pequenas fatias, homogenizados em homogenizador de Potter-Elvehjen com 10 volumes de solução contendo 26 ml de KCl 0,154 M 10 ml KHCO $_3$  0,154 M e 4 ml de MgCl $_2$  0,154 M, saturada com mistura de N $_2$ :CO $_2$  (95:5%) pH 7,4. O homogenado foi então, centrifugado a 0° durante 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga Sorvall RCB-2 (8). O sobrenadante foi coletado e recentrifugado 15 minutos a 10.000 xG a 0° e o sobrenadante límpido, usado como fonte de enzima.

### Pós acetônicos.

Pós acetônicos foram preparados de acôrdo com o método de MORTON (12). Foram preparados pós acetônicos a partir de tecidos de coelho (músculo estriado, músculo cardíaco, rim, figado, baço e cérebro). Coelhos adultos foram sacrificados, os órgãos e tecidos retirados, convenientemente lavados com sôro fisiológico e limpos, tanto quanto possível, de tecido adiposo e de tecido conjun-Tôda operação descrita foi feita em câmara fria, com sôro fisiológico gelado. Antes do tratamento acetônico o material biológico era mantido no congelador por 12 horas e então cortado em pequenas fatias e homogenizado em liquidificador prèviamente resfriado, com acetona redestilada e anidra mantida à temperatura de -20°. O tratamento acetônico era feito na proporção de 1 volume de tecido para 10 volumes de acetona aproximadamente. homogenização procedida em câmara fria foi de 30 segundos, sendo em seguida filtrada a suspensão a vácuo em funil de Buchner e o resíduo tratado, a seguir, com 2, 3 volumes de éter livre de peróxidos, também mantido a -20°. O pó acetônico assim obtido apresentava-se completamente sêco e era conservado em dessecador.

### 4. Purificação parcial das quinases a partir de pó acetônico.

Purificação parcial de enzimas foi levada a efeito a partir de pó acetônico de rim de coelho, por fracionamento com sulfato de amônio (13, 14). A extração de quinase e o seu consequente fracionamento foi feita como se segue, com a finalidade de estudar o comportamento do extrato bruto das frações de 0,3 e 0,6 de saturação de sulfato de amônio, em determinações manométricas.

 $600~\rm mg$  de pêso acetônico foram suspensos em 5 ml de tampão borato 0,2 M pH 7,4 e após homogenização em homogenizador

de Potter-Elvehjem até obter suspensão relativamente uniforme, mantendo a operação à temperatura do gêlo. O material foi deixado em repouso, no gêlo, durante 20 minutos e a seguir centrifugado 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi coletado e usado como fonte de enzima. Ao sobrenadante, solução de sulfato de amônio saturada foi adicionada até saturação de 0,3 de sulfato de amônio. O material foi deixado em repouso, no gêlo, por 20 minutos e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o sedimento dissolvido em 2 ml de tampão borato 0,2 M, pH 7,4 e novamente centrifugado 10 minutos a 10.000 rpm, utilizando-se o sobrenadante para determinação da atividade enzimática. Ao sobrenadante de 0,3 de saturação foi adicionada então solução saturada de sulfato de amônio até 0,6 de saturação, repetindo-se a operação de repouso e de centrifugação descrita e o sedimento também dissolvido em 2 ml de tampão borato 0,2 M pH 7,4 e recentrifugado.

## 5. Purificação de hexoquinases de rim de coelho.

Purificação parcial das hexoguinases contidas no pó acetônico de rim de coelho foi levada a efeito de acôrdo com a técnica seguinte (tôdas as operações em câmara fria) a 2,5 g de pó acetônico foram adicionados 35 ml de tampão borato 0,1 M pH 7,4 e a extração das enzimas procedida em homogenizador de Potter-Elvehjem, por 5 minutos e a suspensão a seguir centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada RCB-2. A 19,4 ml do sobrenadante, mantido em gêlo, foram adicionados 8,4 ml de solução saturada de sulfato de amônio (0,3 de sat.) e após 20 minutos em gêlo a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 O sobrenadante foi coletado e o sedimento dissolvido com 9 ml de tampão borato 0,1 M pH 7,4 e novamente centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante coletado (fração P<sub>10</sub>), enquanto que a 13 ml do sobrenadante foram adicionados 3,5 ml da solução saturada de sulfato de amônio (0,45 saturação) e após 20 minutos de repouso a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e o sedimento foi dissolvido em 9 ml de tampão borato 0,1 M pH 7,4, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante coletado (Fração P<sub>45</sub>). A 16 ml do sobrenadante, 6,0 ml de solução saturada de sulfato de amônio (0,6 sat.) foram adicionados e após repouso de 20 minutos em gêlo, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento dissolvido em 9 ml de tampão borato 0,1 M pH 7,4, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante coletado (Fração  $P_{60}$ ). A concentração de proteínas nas distintas frações foi de 131, 25 mg ml no extrato bruto, 6,92 mg/ml da fração P<sub>30</sub>, 12,40 mg/ml da fração  $P_{45}$  e 8,04 mg/ml na fração  $P_{60}$  (Tabela IV).

#### 6. Métodos analíticos.

Atividade de hexoquinase foi medida em homogenados e em preparações parcialmente purificadas de pós acetônicos de diversos tecidos animais de acôrdo com Bacila e Barron (8) e Nicolau e Bacila (15). Para tanto foram utilizados os sobrenadantes límpidos de homogenados centrifugados a 10.000 xG ou extratos de pós acetônicos e seus precipitados obtidos por salificação com sulfato de amônio conforme se descreve. Os preparados enzimáticos foram analisados quanto à atividade hexoquinasica, manomètricamente, em sistema contendo 1,0 ml de enzima, 0,2 ml de solução ATPNa 0.05 M, 0.1 ml de solução KHCO 0.154 M, 0.2 ml de solução KF 0,05 M e 1,5 ml de tampão ficarbonato contendo 1.10<sup>-3</sup> M de mercaptoetanol. Os frascos restantes contendo no braco lateral 0,2 ml dos substratos glicose, fructose, e galactose em solução 0,2 M, e 1,5 ml de tampão. A fase gasosa era de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5%), à temperatura de 37°. A atividade enzimática das preparações parcialmente purificadas foi determinada com 0,5 ml de enzima idêntica ao descrito, acrescentando ao sistema 0,3 de cisteína 10<sup>-2</sup> M.

A atividade quinásica foi também medida de acôrdo com o método de Leloir e Trucco (16) por determinação de açúcar reduto após precipitar hexoquinase fosfato com sulfato de zinco e hidróxido de bário. Ésse método foi originalmente usado por Colowick et al. (17) para hexoquinase e por Trucco et al. (18) para galactoquinase de S. fragilis e por Bacila (6) para galactoquinase de fígado de rato.

Em trabalhos mais recentes, purificação de hexoquinase de rim de coelho vem sendo feita por Abdo e Bacila (11) a partir de rim de coelho congelado, submetido a processo de extração após descongelamento por homogenização com homogenizador de Potter-Elvehiem, com 2 volumes de tampão TRIS maleato 0,2 M, contendo EDTA na concentração final de 0,05 M, pH final 7,4. Esse tampão é adicionado de mercaptoetanol, na concentração final de 10<sup>-1</sup> M. O homogenado é centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. e o sobrenadante decantado e submetido a precipitação salina com sufato de amônio. Foi assim possível precipitar a atividade hexoquinásica na fração de 0,45 a 0,60 de sat. com sulfato de amônio (purificação de aproximadamente 13 vêzes). Quanto à determinação da atividade da hexoquinase da última preparação, foi utilizado o método espectrofotométrico com sistema de reação contendo glicose 0,2 M, 0,1 ml; ATP, 0,1 M, 0,2 ml; cloreto de magnésio 0,2 M, 0,2 ml; NADP, 10 mg/ml, 0,1 ml; glicilglicina, 0,05 M, pH 8,1 q.s.p. 10 ml; glicose-6-fosfato desidrogenase (10mg/ml) 0,01 ml. A essa solução se adicionou dithiotreitol (reativo de Cleland),  $10^{-3}$  M final. A 1 ml dêsse meio de reação se adicionou quantidade apropriada de material enzimático, e a determinação da velocidade da reação foi

feita pela medida da formação de NADPH-H a 340 nm em espectrofotômetro registrador da marca Gilford.

Contrôle da pureza dos substratos utilizados foi feito por cromatografia em papel. Determinação do teor protéico das preparações utilizadas foi feita pelo micro-método de Kjeldhal (19, 20) para extratos brutos e pelo método espectrofotométrico de Warburg-Christian (21) para as preparações parcialmente purificadas. Essas determinações foram levadas a efeito em espectrofotômetro U.V. - VIS Spectrophotometer Hitachi Perkin Elmer. Foi utilizado ainda o método turbidimétrico de BÜCHER (22) para a determinação do conteúdo protéico das preparações enzimáticas estudadas.

Foram usados D-Glicose (Baker's); D-Manose (Carlo Erba); D-Galactose e D-Fructose (E. Merck); Sulfato de Magnésio (Baker's); Fluoreto de potássio e Cloreto de magnésio (E. Merck); Sulfato de Magnésio (Baker's); Carbonato de potássio (Carlo Erba); 5'-Adenosina-trifosfato sal sódico (Sigma Chemical Company); Sulfato de Zinco e Cloridrato de L ( )-Cisteína (E. Merck); Hidróxido de Bário (Baker's); Mercaptoetanol (B.D.H. (The British Drug Houses Ltd.)); Sulfato de Amônio (Baker's); N-Etil-Maleimida (Schwarz Bioresearch); Ácido p-hidroxi-mercúrio-benzóico, (Sigma Chemical Company); Colidina para cromatografia, (Carlo Erba); Acetona (Fischer); Éter etilico comercial altamente destilado; Reativos Somogyi — Nelson (19); Tampões maleato, borato, glicina OH e succinato (23).

#### RESULTADOS

1. Exploração de atividade hexoquinásica em tecidos animais.

Em diversos tecidos animais, môrmente em fígado bovino e rim de coelho (Tabela I), há atividade bem definida de galactoquinase e de outras hexoquinases, confirmando a ampla distribuição destas últimas enzimas por todos os tecidos animais e a distribuição mais restrita da galactoquinase.

2. Atividade de hexoquinase de preparação de pós acetônicos de diversos tecidos de coelho.

Em extratos de pós acetônicos de diversos órgãos e tecidos de coelho (Tabela II) foi feito estudo comparativo da atividade hexoquinásica nêles contida.

 Fracionamento das hexoquinases de pó acetônico de rim de coelho.

Rim de coelho, tomado como material de escolha em face aos resultados preliminares obtidos, foi estudado quanto à atividade hexoquinásica em preparações parcialmente purificadas (Tabela

TABELA I — Atividade de hexoquinase de diferentes tecidos animais em homogenados

	Fonte	1 (	CO <sub>2</sub> desenvolvi	dos	Ativid per	lade comparad centagem relat	Proteina	Tempo do experimento	
		Glicose	Galactose	Fructose	Glicose	Galactose	Fructose	(mg/ml)	(minutos)
Cérebro	bovino	11,3	0,0	5,9	100	_	46,3	1,9	12
	coelho	79,1	7,3	97,7	100	9,1	123,0	2,81	60
Coração	rato	80,7	9,7	20,0	100	12,0	24,8	1,5	20
Intestino	rato	7,16	21,0	17,0	100	340	237		20
	coelho	<b>25</b> ,0	18,0	10.0	100	72	40		20
Rim	coelho	25,5	27,5	23,1	100	107,8	90,6	_	15
	coelho	69,6	59,6	136,5	100	85,0	166,6	_	_
Figado	bovino	17,7	25,3	21,3	100	143.0	120	_	15
	rato	15,37	11,6	10,85	100	75,5	70	-	20
Músculo	rato	273	_		100	0	0	4,16	60
	rato	371,5	_		100	0	0		120
	rato	212	_	-	100	0	0	4,31	120
	rato	151,4	_	_	100	0	0	3,95	120
		200,4	<u> </u>	_	100	0	0		60

Média de várias experiências.

Tecidos homogenados em 10 volumes de solução contendo 26 ml de KCl a 0,154 M, 10 ml de KHCO3, 0,154 M, e 4 ml de MgCl2 a 0,154 M, saturada com mistura de  $N_2$ :  $CO_2$  (95:5%) até pH 7,4. O homogenado era centrifugado a 0° durante 10 min. a 5.000 rpm em centrifuga Sorvall RCB2. O sobrenadante foi coletado e centrifugado 15 min. a 10.000 g e o sobrenadante limpido utilizado como fonte de enzina. Determinação de atividade enzimática foi feita a 37° em respirômetro de Warburg, em sistema contendo 1,0 ml da solução de enzima, 0,2 ml de solução 0,05 M de KF e 1,5 ml de solução tampão bicarbonato contendo 1.10-3M de mercaptoetanol (fase gasosa de  $N_2$ : $CO_2$ , 95:5%). Substrato (0,2 ml de solução 0,2 M) era adicionado a partir do braço lateral ao "tempo zero" de cada experimento.

III). Possuindo atividade galactoquinásica muito bem definida e pela primeira vez constatada em material biológico dessa natureza, tornou-se objeto de investigações mais detalhadas, considerando a possibilidade de purificação das hexoquinases nêle contidas, já que em experimentos posteriormente levados a efeito (Tabela V), além de fructose e glicose, manose foi também utilizada como substrato.

# 4. Atividade hexoquinásica de frações parcialmente purificadas de pó acetônico de rim de coelho.

Diferentes frações purificadas por salificação com sulfato de amônia a partir de extrato bruto de pó acetônico de rim de coelho possuem atividade enzimática de fosforilação de glicose, fructose, manose e de galactose (Tabela IV). Nas frações de 0,3, 0,45 e 0,60 de saturação com sulfato de amônio há precipitação parcial de tal atividade, mas a atividade específica é sempre maior na fração de 0,6 de saturação. A possibilidade de se tratarem de duas enzimas apenas, isto é, de hexoquinase que, a exemplo da de levedura é capaz de fosforilar glicose, fructose ou manose e de galactoquinase ou então de hexoquinases específicas para os distintos substratos utilizados, não pode ainda ser decidida pela presente experiência, sem que possa pairar dúvida no que diz respeito ao fato de que a enzima que catalisa a fosforilação da galactose é específica e distinta das enzimas envolvidas na fosforilação das outras hexoses. Entretanto, como a fração P<sub>60</sub>, em todos os casos foi a de maior grau de purificação, tôdas as experiências seguintes foram levadas a efeito com a mesma.

## 5. Estabilidade da atividade hexoquinásica da fração P<sub>60</sub>.

Fração  $P_{60}$  conservada em estado de congelação, quando dissolvida em tampão borato 0,1M pH 7,4, foi estudada quanto à atividade de galactoquinase. Foi verificado que a atividade dessa enzima decresce de 98,4% após ser mantida em congelamento por 15 dias.

Por outro lado, a estabilidade do calor (temperatura de inativação) foi estudada quanto à atividade de glicoquinase e de fructoquinase, dentre as atividades hexoquinásicas da fração  $P_{60}$ . Incubando-se alíquotas da solução enzima, antes da sua utilização para medida da atividade, por 20 minutos, às temperaturas que variavam de 30° a 70° (30°, 40°, 50°, 60° e 70°) e logo em seguida medindo a sua atividade da maneira já descrita, verificou-se que a sua função catalítica se mantém estável até 40°, sendo que alíquotas incubadas a partir de 50° mostram perda progressiva de atividade (Tabela V).

Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo — Vol. 8 fasc. 1, 1969

TABELA II - Atividade de hexoquinases em pós acetônicos de diversos tecidos de coelho

Experimento		E	volução de C	$O_2$	Ati	ividade compa	rada	Proteinas	Tempo
(N.º)	Tecido	Glicose	Galactose	Fructose	Glicose	Galactose	Fructose	(mg/ml)	(minutos)
6	rim	34,7	25,9	51,9	100	74	149	54,09	30
17	rim	85,8	71,2	105,1	100	82,9	122,5	34,3	30
14	rim	11,2	14,3	47,4	100	127,6	423	14,6	60
15	rim	16,6	18,3	50,8	100	110,2	306	14,9	60
16	rim	9,0	18,0	59,7	100	200	663,3	17,1	60
9	coração	117,2	62,9	136,1	100	53,5	115,9	34,7	30
9	cérebro	217,2	50,5	<b>7</b> 9, <b>3</b>	100	23,2	36,9	38,9	30
12	baço	63	35,6		100	56,5	_	<b>2</b> 8,5	60
13	figado	17,9	14,0	44,3	100	89	191	26,9	60

Enzima foi preparada a partir de 150 mg de pó acetônico adicionado de 2,5 ml de tampão bicarbonato, pH 7,4. Após homogenizar em homogenizador de Potter-Elvehlem e repouso por 20 minutos em gêlo, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm em Centrifuga Sorvall RCB 2. O sobrenadante foi usado como fonte de enzima e a atividade hexoquinásica medida manomètricamente em sistema contendo 1,0 ml de enzima, 0,2 ml de solução 0,05 M de ATP, 0,1 ml de solução 0,154 M de KHCO<sub>3</sub> e 1,7 ml de tampão bicarbonato contendo 36 ml de solução 0,154 M de KCl, 10 ml de solução 0,154 M de KHCI<sub>3</sub>, 4 ml de solução 0,154 M de MgCl<sub>2</sub> e o pH acertado para 7,4 com N<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> (95:5%). Substrato (0,2 ml de solução 0,2 M) adicionado do braço lateral dos frascos de Warburg, ao "tempo zero" e a fase gasosa mantida com N<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> (95:5%). As medidas foram feitas em banho a 37°, com 100 agitações por minuto.

TABELA III — Estudo da atividade hexoquinásica em preparações parcialmente purificadas a partir de pó acetônico de rim de coelho

Experimento		Proteina (mg/ml)			Evoluç		(μl <b>1</b> )	minutos	\$			
N.º I	Extrato bruto	Precipitado 0,3 sat.	Precipitado 0,6 sat.				stratos de Enzin	na				
	(1)	(2)	(3)	Fruc	ctose	Gala	ctose	Glie	ose			
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
19	7.5	5,2	5,0	23,2	100,4	57,9						
21	7,6	3,0	3,72				35,6	32,3	40,8			
22	6,8	2,0	2,46							46,3	27,9	40,

Enzima foi preparada a partir de 600 mg de pó acetônico adicionado de 5 ml de tampão borato pH 7,4, 0,1 M e homogenizada em homogenizador de Potter-Elvehjem até obter relativamente uniforme, que era mantida por 20 minutos à temperatura do gêlo e a seguir centrifugada 10 min. a 5.000 rpm em centrifuga Sorvall RCB2. O sobrenadante coletado era usado como fonte de enzima. O sobrenadante (1 ml) foi utilizado para medida da atividade e também para precipitação sucessiva a 0,3 e 0,6 de sat. com sulfato de amônio e em cada caso a suspensão mantida por 20 minutos à temperatura do gêlo e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Os sedimentos foram dissolvidos com 2 ml de tampão borato 0,2 M, pH 7,4 e após centrifugação de 10 minutos a 10.000 rpm, os sobrenadantes (0,5 ml) utilizados para determinação da atividade enzimática. Medida manométrica da atividade hexoquinásica foi feita em sistema con tendo 0,1 ml de enzina, 0,2 de solução 0,05 M de ATP, 0,1 ml de solução 0,154 M de KHCO<sub>3</sub> e 1,7 ml de tampão bicarbonato contendo 36 ml de solução 0,154 M de KCl, 10 ml de solução 0,154 M de KHCO<sub>3</sub>, 4 ml de solução 0,154 M de MgCl<sub>2</sub> e o pH acertado para 7,4 com N<sub>2</sub>:CO<sub>3</sub> (95:5%). Substrato (0,2 ml de solução 0,2 M) adicionado do braço lateral dos frascos de Warburg, ao "tempo zero" e a fase gasosa mantida com N<sub>3</sub> (95:5%). As medidas foram feitas em banho a 37°, com 100 agitações por minuto.

TABELA IV — Atividade hexoquinásica das frações purificadas a partir de pós acetônicos de rim de coelho

Frações					Sub	stratos						
		Glicose			<b>F</b> ructose			Manose			Galactos	se
	Unida- des por ml	Ativida- de espe- cífica (Q)	Purifi- cação (X)	Unida- des por ml	Ativida- de espe- cífica (Q)	Purifi- cação (X)	Unida- des por ml	Ativida- de espe- cifica ((Q)	Purifi- cação (X)	Unida- des por ml	Ativida- de espe- cífica (Q)	Purifi- cação (X)
Extrato bruto	14,9	0,11		11	0,083	_	2,0	0,015		3,9	0,029	_
$P_{30}$	26,8	3,87	35,1	32	2,13	55,6	14,0	2,02	134	4,6	0,66	22,7
$\mathbf{P}_{45}$	53	4,27	38,8	46	3,70	44,57	20,0	1,6	14,62	12.2	0.98	33,7
$\mathbf{P}_{00}$	81	10,0	90,98	81	10,07	120,0	85,0	10,5	700	81.0	10,07	344,7

Atividade enzimática medida em sistema contendo a) tampão maleato 0,1 M pH 7,4, 0,2 ml; b) sulfato de magnésio 0,1 M, 0,2 ml; c) ATP (40  $\mu$  moles/ml), 0,2 ml; d) substrato (10  $\mu$  moles/ml); e) enzima, 0,1 ml. Incubação a 300 por 20 minutos. A reação é interrompida pela adição de 0,5 ml de solução a 5% de sulfato de zinco e a medida de açúcar redutor procedida em alíquota do sobrenadante desproteinizado e também livre de ésteres fosfóricos de hexoses. Unidade é definida como sendo quantidade de enzima necessária para esterificar 0,1  $\mu$  moles de hexose em 20 minutos. Atividade específica é tomada como sendo o número de unidades de enzima por mg de proteina por ml.

Substrato	Temperatura (°C)	Atividade (por cento)
Glicose	30	100
	40	100
	50	80
	60	77
	70	55,5
Fructose	30	100
	40	100
	50	89
	60	70,8
	70	61
Manose	30	100
	40	100
	50	_
	60	94,5
	70	85,5

TABELA V — Temperatura de inativação da atividade hexoquinásica da fração  $P_{\theta\theta}$ 

Alíquotas da fração  $P_{00}$  foram previamente incubadas por 20 minutos em banho maria ajustado para as diferentes temperaturas indicadas na experiência. Ao final dêsse período a atividade enzimática era medida em sistema contendo tampão maleato 0,1 M, pH 7,4, 0,2 ml; sulfato de magnésio 0,1 M, 0,2 ml; ATP (40  $\mu$  moles/ml) 0,1 ml; enzima, 0,1 ml. A reação era in terrompida pela adição de 0,5 ml de solução de sulfato de zinco e a medida de açúcar redutor procedida em alíquota do sobrenadante desproteinizado e também livre de ésteres fosfóricos de hexoses.

# 6. Efeito de temperatura sobre a ativação das hexoquinases da fração $P_{so}$ .

Os dados para pH ótimo das diversas atividades hexoquinásicas da fração  $P_{60}$  revelaram valores para tôdas elas, entre 6,8-7,4. As determinações foram levadas a efeito entre pH 4,0 e 9,0, com tampões succinato (pH 4,0 e 5,0), maleato (pH 6,0, 6,8, 7,4) e glicina (pH 8,0, 8,6 e 9,0).

# 8. Efeito de reagentes sulfidrílicos sobre atividade hexoquinásica da fração $P_{60}$ .

Noretilmaleimida (NEM) e p-hidroximercuribenzoato (PHMB) são capazes de impedir a atividades hexoquinásica da fração  $P_{60}$ . Comparativamente às concentrações de inibidor usadas, NEM é menos eficiente que o PHMB, já que em concentrações menores êste último é capaz de atividade inibitória mais acentuada que o NEM (Tabela VII). Aliás a dependência da ação das hexoquinases com respeito à integridade dos seus grupos sulfidrílicos é fato estabelecido para a hexoquinase por NICOLAU e BACILA (15) e para a galactoquinase de  $Saccharomyces\ fragilis$ . No caso presente o efeito

Temperatura	Unidas ativ (1	as de enzima ml)		Galactose	
(°C)	Manose	Galactose	Intervalo	Manose	
30	61	57,1			
40	75	76,2	30-400	1,23	1,33
50	98	95,7	40-500	1,30	1,25
60	91	90,5	50-600	0,92	0,94
70	58	75,5	60-700	0,63	0,83

TABELA VI — Temperatura de ativação das hexoquinases da fração P<sub>00</sub>

Sistema: 0,2 ml tampão maleato 0,1 M, pH 7,4; 0,2 ml sulfato de magnésio 0,1 M; 0,2 ml de ATP (40  $\mu$  moles/ml); 0,1 ml de substrato (10  $\mu$  moles/ml), 0,1 ml de enzima. Incubação às temperaturas de 30°, 40°, 50°, 60° e 70°, por 20 minutos, foi procedida, interrompendo-se a reação por adição de 0,5 ml de solução a 5% de sulfato de zinco. A medida do açúcar redutor foi procedida em aliquota de sobrenadante desproteinizado e livre de ésteres fosfóricos de hexoses. Para verificação do efeito ativante da temperatura, sistemas separados foram usados.

inibitório do NEM e do PHMB foi patenteado em todos os substratos estudados em sistemas semelhantes do utilizado na Tab. VII. É evidente, porém, que a titulação de grupos sulfidrílicos das quinases indicadas só será possível em material altamente purificado, quando então, análise cuidadosa de grupos sulfidrílicos essenciais e daqueles não essenciais será possível, provàvelmente pela utilização do mesmo sistema proposto por NICOLAU e BACILA (15), para aldolase de fructose-1,6-difosfato, graças ao efeito que derivados da acilsarcosina exercem sôbre a estrutura da proteína, permitindo expor grupos sulfidrílicos que se encontram sepultados nas proteínas nativas.

TABELA VII — Efeito de reagentes de grupos sulfidrílicos sôbre a atividade fructoquinásica da fração  $P_{60}$ 

Sistema	Unidades ativas de enzimas por ml	Inibição (%)	
NEM * 2.10-4M	57	<del></del>	
NEM 2.10-4M	54	5,2	
4.10-4M	49	14,2	
6.10- <sup>4</sup> M	47	17,6	
10-3M	27	52,7	
p-OHMB** 5.105M	52	8,8	
10-4M	36	36,8	
5.10- <sup>4</sup> M	34	40,4	
$2.10^{-4}M$	25	56,2	

<sup>\*</sup> NEM:noretilmaleimida; \*\* p-OHMB: parahidroximecuribenzoato.

Sistema contém: tampão maleato 0,02 M, pH 7,4; sulfato de magnésio, 0,2 M, ATP 8  $\mu$  moles; fructose, 1 mole; enzima 0,98 mg de proteína; NEM e POHMB, em concentrações apropriadas tendo sido adicionadas ao sistema antes de iniciada a reação pela adição de 1  $\mu$  mole de substrato. Incubar a 30° por 20 minutos, a reação sendo interrompida pela adição de 0,2 ml de ZnSO4 a 5%.

#### DISCUSSÃO

Tecidos de coelho, mormente fígado e rim, oferecem particular interêsse para o estudo de hexoquinases. No caso da galactoquinase, o rim de coelho oferece razoáveis perspectivas para a sua purificação no mais alto grau, considerando o fato de que em preparações parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônio a partir de extratos de pó acetônico, essa quinase mostra-se particularmente ativa, permitindo antever a possibilidade do seu estudo mais pormenorizado. Galactoquinase foi pela primeira vez estudada em preparados de Saccharomyces fragilis cultivado em meio contendo lactose por Caputto, Leloir e Trucco (5) e em figado de rato por Bacila (6). A sua dependência para grupos sulfidrílicos foi determinada com a enzima de S. fragilis por Bacila (6) e aspectos cinéticos da sua atividade foram examinados mais recentemente por Cleland (24) com preparações de Escherichia coli.

A possibilidade de que as hexoquinases encontradas em rim de coelho sejam enzimas distintas, na dependência dos substratos utilizados, é aparente nos resultados aqui obtidos, se bem que não se pode ainda decidir em definitivo sôbre êsse ponto, no estado atual das experimentações já realizadas. Esse fato é indubitável para o caso da galactoquinase por se tratar de enzima específica e bem caracterizada como tal. Entretanto, no que diz respeito à fosforilação da glicose, da fructose e da manose, que no caso da hexoquinase da levedura e da hexoquinase de fígado de rato são fosforiladas pela mesma enzimas, certos aspectos das experimentações aqui levadas a efeito permitem prever que não se trata de uma única enzima. É evidente que ao longo de sua purificação, tôda a atividade hexoquinásica, incluindo a da galactoquinase, é mais concentrada na fração P<sub>60</sub> (0,6 sat. com sulfato de amônio), mas é notável o fato de que ao serem analisadas quanto à sua temperatura de ativação, a que fosforila manose parece comportar-se de modo distinto ao das demais quinases.

Trabalhos de purificação a partir da fração  $P_{\mbox{\tiny 60}}$  estão agora em andamento neste Departamento.

## SUMMARY

Rabbit kidney has been used as a source for the purification of hexokinases. Phosphorylation of glucose, fructose, mannose, and galactose were accomplished by crude extracts, and by partialy purified preparations obtained from acetone powders prepared from prefrozen kidneys. Hexokinase activity in rabbit tissues was assayed in kidney, heart, brain, spleen and liver, and the relative activity for glucose, galactose, and fructose, measured taking the phosphorylating activity for glucose as 100 per cent. It has been shown that kidney contains the highest activity in galactokinase, this activity being higher than the phosphorylating effect of the preparations toward glucose.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. MEYERHOF, O. "Uber die enzymatishe milchsäurebildung in muskelextrakt". Biochem. Z. 183:176-215, 1927.
- 2. WALKER, D. G. "The nature and function of hexokinases in animal tissues". Essays in Biochemistry. V. 2 London, Academic Press, 1966 p. 33.
- 3. KUNITZ, M. & MAC DONALD, M. R. "Crystalline Hexokinase". J. Gen. Physiol. 29:393, 1946.
- 4. BAILEY, K. & WEBB, E. C. "Purification of yeast hexokinase and its reaction with  $\beta\beta$ '-Dichlorodiethyl sulphide". *Biochem. J.*, 42:60, 1948.
- 5. CAPUTTO, R.; LELOIR, L. F.; TRUCCO, R. E. "Lactase and lactose fermentation in Saccharomyces fragilis". Enzymologiu. 12:350, 1948.
- 6. BACILA, M. "A presença da galactoquinase em tecidos animais". Arg. Biol. Tecn. 3:3, 1948.
- 7. BACILA, M. "Determinação dos grupos SH na galactoquinase". Ciência e Cultura. 3:292, 1951.
- 8. BACILA, M.; BARRON, E. S. G. "The effect of adrenocortical hormones on the anaerobic glycolysis and hexokinase activity". *Endocrinology* 54:591, 1954.
- 9. FIGUEIREDO, J. B.; ABDO, A. M. & BACILA, M. "Distribuição de atividade hexoquinásica em tecidos animais". *Ciência e Cultura.* 21: 505, 1969.
- 10. FIGUEIREDO, J. B. & BACILA, M. "Purificação de hexoquinase de rim de coelho". Ciência e Cultura. 21:518, 1969.
- 11. ABDO, A. M. & BACILA, M. Dados não publicados.
- 12. MORTON, R. K. "Methods of extraction of enzymes from animal tissues". *Methods in Enzymology*. v. 1. New York, Academic Press, 1955. p. 54.
- 13. WILKINSON, J. F. "The pathway of the adaptive fermentation of galactose by yeast". *Biochem. J.* 44:460, 1949.
- 14. GREEN, A. A. & HUGHES, W. L. "Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents". *Methods in Enzymology 1*:67 New York, Academic Press, 1955.
- 15. NICOLAU, J. & BACILA, M. "N-acylsarcosines as inhibitors of respiration and glycolysis and glycolytic enzymes". *Arch. Bioch. Bioph.* 129:357, 1969.
- LELOIR, L. F. & TRUCCO, R. E. "Galactokinase and galactowaldenase". Methods in Enzymology 1:290 New York, Academic Press, 1955.
- 17. COLOWICK, S. P.; CORI, G. T.; SLEIN, M. W. "The effect of adrenal cortex and anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinase reaction". *J. Biol. Chem. 168*:583, 1947.

- 18. TRUCCO, R. E.; CAPUTTO, R.; LELOIR, L. F. & MITTELMAN, W. "Galactokinase". Arch. Biochem. 18:137-146, 1948.
- 19. FARIA, M. A. & BACILA, M. "Determinação do nitrogênio total do plasma ou sôro". Guia de trabalhos práticos de Bioquímica e Patologia Geral. Curitiba, Diretório Acadêmico de Agronomia e Veterinária do Paraná, 1956 p. 125.
- 20. FONTANA, P. "Considerações sôbre a dosagem do nitrogênio pelo método de Kjeldahl". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 51*:227, 1953.
- 21. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. "Isolierung und Kristallisation des gärungsferments Enolase". *Biochem.* Z. 310:384, 1941.
- 22. BÜCHER, T. "Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment".  $Biochim.\ Biophys.\ Acta.\ 1:292,\ 1947.$
- 23. GOMORI, G. "Preparation of buffers for use in enzyme studies". Methods in Enzymology v. 2 New York, Academic Press, 1955 p. 138.
- 24. CLELAND, W. W. "Enzyme kinetics". *Ann. Rev. Biochem.* 36:77-112, 1967.