

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA E BIOFISICA

Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

PURIFICAÇÃO DE ADOLASE DE CORAÇÃO DE BOVINO

(PURIFICATION OF BEEF-HEART FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHATE
ALDOLASE)

DARIO OCAMPOS
Instrutor

METRY BACILA
Prof. Catedrático

INTRODUÇÃO

A existência de aldolase de músculo cardíaco foi determinada em coelho por MEYERHOF e LOHMAN (1934) e em coração de rato por SIEBLEY e LEHNINGER (1949). Entretanto, apesar de ter sido estudada em correlação com vários problemas patológicos, nenhum trabalho de purificação dessa enzima foi levado a efeito. Tais estudos são do maior interesse, considerando-se as análises comparativas sobre estrutura e ação de aldolases de diversas origens que têm sido levadas a efeito em especial após o trabalho de LAI, HOFFEE e HORECKER (1965), com aldolase de músculo de coelho, em que se determinou a reatividade do resíduo de lisina no peptídeo do sítio ativo, bem como a estrutura deste último, a importância para a reatividade da enzima de grupos sulfidrilícos essenciais, neste caso, sugerindo que o resíduo de cisteína ali encontrado esteja envolvido na reação catalítica da enzima.

Não é essencial afirmar da importância que representa a aldolase de fructose-1, 6-difosfato para a atividade bioquímica e fisiológica do miocárdio, como enzima central que é da sua atividade glicolítica. A sua purificação (OCAMPOS e BACILA, 1968), foi levada a efeito a partir de músculo cardíaco de bovino por extração alcalina e posterior precipitação por "salting out" de soluções de sulfato de amônio. Nessas preparações, contudo, a purificação da aldolase de coração de boi foge de modo total ao esquema da purificação da aldolase de músculo de coelho pelo método de TAYLOR, GREEN e CORI (1948), pelo qual em concentrações de sulfato de amônio da ordem de 0,52 — 0,56 de sat. ocorre cristalização da enzima. No caso da aldolase de coração de bovino (ACB), porém, tal não se passa, já que são necessárias concentrações bem mais

altas de sulfato de amônio para precipitar das soluções a ACB, que além do mais, sempre se encontra associada com hemoglobina, o que introduz tôda uma problemática no processo de separação de ambas as proteínas e da purificação da ACB, estudos êsses que são objetos do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação da aldolase de fructose-1, 6-difosfato foi procedida, de início, segundo o método de TAYLOR, GREEN e CORI (1948) empregado para a cristalização de aldolase de músculo de coelho. Entretanto, dado o peculiar comportamento da ACB com respeito ao processo de precipitação salina, muito distinto do que ocorre com a aldolase de músculo de coelho, o seguinte processo foi utilizado, já que a sistemática presença de hemoglobina, associada à fração responsável pela atividade de aldolase exigiu considerável trabalho no sentido de purificar a enzima da presença da hemo-proteína como etapa preliminar de purificação.

Precipitação com sulfato de amônio — Músculo cardíaco (600 g) libertado tanto quanto possível de outros tecidos e moído em máquinas de moer carne, foi extraído com KOH, 0,03 N, na proporção de 1 ml por grama e depois de filtrado, reextraído com KOH 0,03 N na proporção de 0,9 ml por grama de pêso. Os filtrados foram adicionados e o pH ajustado para 7,6 com KOH 3 N. A 800 ml de solução do material extraído foram adicionados 520 ml de solução saturada de sulfato de amônio (0,4 sat.), permanecendo em suave agitação por 40 minutos a 2°C e depois centrifugado por 15 min. a 10.000 rpm. A 1150 ml do sobrenadante foram adicionados 230 ml de sol. sat. de $(NH_4)_2SO_4$, elevando a saturação do sal para 0,5 sat. Após 3 dias de suave agitação a 2°C, o material foi centrifugado 15 minutos a 10.000 rpm. O sedimento foi dissolvido em 80 ml de tampão borato 0,2 M, pH 7, e o sobrenadante (1200 ml), elevado para 0,55 de saturação com sulfato de amônio, permaneceu em agitação por 120 horas, a 2°C, e depois centrifugado 15 minutos a 10.000 rpm. O sedimento foi dissolvido em 25 ml de tampão borato 0,2 M pH 7,6 e o sobrenadante (1150 ml) saturado para 0,65 de sat. pela adição de 128 ml de sol. sat. de sulfato de amônio. Após agitação por 24 horas a 0°C, foi centrifugado 10 min. a 10.000 rpm. Sedimento e sobrenadante foram coletados e o primeiro dissolvido em tampão borato 0,2 M. A proteína do sobrenadante de 0,65 sat., ainda contendo cêrca de 60 por cento do total da atividade enzimática, foi totalmente precipitada por saturação com sulfato de amônio. Após 120 horas de repouso em câmara fria, a suspensão foi centrifugada 10 minutos a 10.000 rpm, o sedimento dissolvido em 100 ml de tampão borato 0,2 M, pH 7,6, centrifugado 10 min. a 10.000 rpm.

Filtração a gel. — Solução de enzima foi dializada durante 48 horas contra tampão borato 0,2 M, pH 7,6 contendo EDTA, 0,1 M e mercaptoetanol 10^{-3} M. A solução do material enzimático precipitado entre 0,65 e 1,0 sat. de sulfato de amônio, ainda contendo pigmentação, foi fracionado por filtração em gel de Sephadex G25. Em coluna de 50 cm por 1,30 cm de diâmetro, contendo Sephadex G25 entumescido com água destilada, foram adicionados 5 ml da solução de enzima contendo 75 mg de proteína. A eluição foi feita com tampão borato 0,2 M, pH 7,6 (eluente para cromatografia: tampão borato 0,2 M, pH 7,6 contendo 1 ml de EDTA 0,1 M para cada 100 ml de tampão), com velocidade de fluxo de 3,0 ml por 5 minutos. Foram colecionadas 30 frações.

Repurificação — As frações ativas foram reunidas e a aldolase repurificada por precipitações sucessivas com sulfato de amônio, a 0,4, 0,5 e 0,6 de sat. em sulfato de amônio, sucessivamente, a intervalos de 72 horas entre cada etapa, durante as quais as suspensões permaneciam em suave agitação, a 2°C. A preparação obtida a 0,6 de sat. se mostrou aparentemente livre de pigmentação devida à presença de hemoproteína.

Determinação de aldolase foi levada a efeito pelo método descrito por RACKER (1947). A mistura de reação continha 2mM de fructose-1,6-difosfato, 0,2 mM de NADH, 50 mM de tampão de trietanolamina, pH 7,4, 1,0 mM de EDTA e uma mistura de glicerofosfato desidrogenase e triosefosfatoisomerase (10 mg). Diminuição em absorbância a 340 mm seguida da adição de quantidades apropriadas de enzima foi medida em espectrofotômetro Hitachi-Perkin-Elmer.

Concentração de proteína nas preparações de aldolase foram medidas de acordo com o método de avaliação de aldolase pelas medidas de absorbância a 280 mm usando o fator 0,91 unidades de absorbância por mg de proteína e por ml, de acordo com BARANOWSKY e NIEDERLAND (1949).

Fructose-1,6-difosfato foi obtida da Sigma Chemical Co., triosefosfatoisomerase e α -glicerofosfato desidrogenase, da Boehringer e Soehne, Mannheim-Wadhof, 2-mercaptoetanol da Eastman Organic Chemicals, NADH, da Sigma Chemical Co., EDTA e TRIS, de Fisher Scientific Co.

RESULTADOS

1. *Precipitação salina* — A extração e a precipitação por sulfato de amônio conduziram a uma preparação que a 0,65 sat. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentava atividade específica da ordem de 0,22 e 1,6 para o precipitado e sobrenadante respectivamente, muito

baixa quando comparada com a atividade específica das preparações similares de aldolase de músculo de coelho. O sobrenadante, contendo 61 por cento do total de unidades de preparação inicial, foi levado a 1,0 sat. com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tendo o precipitado uma atividade específica de 3,3 e o sobrenadante sendo inativo. (Tabela I).

TABELA I — Purificação de aldolase de coração de bovino

	Atividade específica	Purificação (X)	Unidades totais
Extrato borato 0,5 sat.	—	—	—
Precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
a) Sobrenadante	0,76	—	14.400
b) Precipitado 0,55 sat.	0,84	—	1.920
a) Sobrenadante	1,8	—	14.750
b) Precipitado 0,65 sat.	0,44	—	475
a) Sobrenadante	1,6	—	9.600
b) Precipitado 1,0 sat.	0,22	—	150
a) Precipitado	3,3	2,0	9.200

O extrato alcalino do miocárdio de bovino foi submetido a sucessivas precipitações com sulfato de amônio. A 0,65 de sat. com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 66,6 das unidades totais do extrato bruto permaneceram dissolvidas e foram precipitadas apenas quando a concentração de sulfato de amônio foi elevada para 1,0. A preparação assim obtida era bastante impura, com atividade específica ainda baixa e contendo forte associação de proteínas pigmentadas do coração.

2. *Filtração em gel.* — As proteínas precipitadas com sulfato de amônio a 1,0 de saturação foram submetidas a filtração em gel de Sephadex G 25 e eluídas com tampão borato 0,1 M, pH 7,4. Foram coletadas 30 frações, sendo que toda a atividade estava contida nas frações de 5 a 8, que combinadas, apresentavam a atividade específica de 5,6 (Tabela II).

3. *Repurificação das frações ativas da filtração em gel* — As frações ativas resultantes da filtração em Sephadex G-25 foram combinadas e repurificadas por salificação com sulfato de amônio, (atividade específica de ordem de 44,0) com purificação de 27 vezes em relação à preparação em 0,65 sat. (Tabela II).

TABELA II — Repurificação das frações ativas obtidas por filtração em Gel de Sephadex A 25

	Frações	Atividade específica	Purificação (X)
Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da proteína contida nas frações 5, 6, 7, 8	0,4 Sat. — Precipitado	5,6	3,5
	0,5 Sat. — Precipitado	20,8	13,0
	0,6 Sat. — Precipitado	44,0	25,8

As frações 5, 6, 7 e 8 foram reunidas e submetidas à diálise contra tampão borato 0,2 M, EDTA 0,1 M e mercaptoetanol 1×10^{-3} M, durante 48 horas, trocando-se o líquido de diálise a cada 12 horas, sendo odializado a seguir submetido a precipitação sucessiva com sulfato de amônia pH 7,6. A 0,4 de sat. o sobrenadante estava inativo, e o precipitado ressuspenso em tampão borato 0,2 M, pH 7,6, foi levado a 0,5 sat., sendo o precipitado resultante elevado a 0,6 sat.

DISCUSSÃO

Aldolase de fructose-1,6-difosfato de músculo cardíaco de bovino é extraída por soluções alcalinas como ocorre com a aldolase de músculo de coelho segundo o clássico método de TAYLOR, GREEN e CORI (1948). Entretanto, a preparação se acompanha de forte contaminação de hemoproteínas associadas à atividade enzimática durante todas as fases da preparação. Após precipitações e fracionamentos sucessivos por sulfato de amônio ou através de peneiras moleculares, foi possível purificar a preparação 25,8 vezes, até atividade específica igual a 44,0. Nessas condições, as preparações de aldolase-1,6-difosfato de coração de bovino apresentam comportamento muito distinto daquelas de músculo de coelho.

Experiências ainda não publicadas demonstram que ACB é muito sensível à ação desnaturante do palmitoil-sarcosinato de sódio (NICOLAU e BACILA, 1968), a exemplo do que ocorre com a aldolase da fructose-1,6-difosfato de músculo de coelho.

Outros experimentos de purificação de enzima estão em prosseguimento, com a utilização de peneiras molecular de Sephadex G-25 e G-100 e DEAE-Celulose em combinação com processos de repurificação por saificação.

SUMÁRIO

Aldolase de fructose-1,6-difosfato foi purificada a partir de músculo cardíaco de boi. A enzima foi obtida por extração alcalina.

lina e precipitação com sulfato de amônio. Entretanto, ao contrário da aldolase de músculo de coelho, cuja cristalização ocorre quando soluções de sulfato de amônio atingem concentrações da ordem de 0,5 — 0,6 de saturação, aldolase de coração de boi não só não cristaliza como precipita apenas em concentrações muito superiores de sulfato de amônio. Por outro lado, essa enzima se encontra sempre em íntima associação com hemoglobina. Por sucessiva repurificação e por passagem em peneiras moleculares, foi possível obter preparações relativamente puras e tão livres quanto possível de pigmento de heme proteína.

SUMMARY

Fructose-1,6-diphosphate aldolase was purified from beef heart by alkaline extraction and ammonium sulfate precipitation. Through the different steps, enzyme activity was always accompanied by heme protein, even in the best purified fractions. The behaviour of beef heart aldolase is quite different from the rabbit muscle aldolase which crystalizes at 0.52 — 0.56 saturation of ammonium sulfate. Beef heart aldolase precipitates at higher concentrations of ammonium sulfate but crystallization is not achieved in spite of the fact that reasonable activity is being found in several preparations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARANOWSKI, T. & NIEDERLAND, T. R. — 1949 — Aldolase activity of myogen A. *J. Biol. Chem.* 180:543.
2. LAI, C.Y.; HOFFEE, P.; HORECKER, B. L. — 1965 — Mechanism of action of aldolases. XII. Primary structure around the substrate binding site of rabbit muscle aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 112:567.
3. MEYERHOF, O. & LOHMAN, K. — 1934 — Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. II. Über Abfangen der Triosephosphorsäure mit Bisulfit und die Verbreitung des Ferments "Zymohexase" in den verschiedenen Zellarten. *Bioch. Z.* 273:413.
4. OCAMPOS, D. & BACILA, M. — 1968 — Purificação de aldolase da fructose-1,6-difosfato de coração de bovino. *Ciência e Cultura*, Abstract N.º 553, 20:373.
5. RACKER, E. — 1947 — Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity. *J. Biol. Chem.* 167:843.
6. SIEBLEY, G. A. & LEHNINGER, A. L. — 1949 — Determination of aldolase in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 177:859.
7. TAYLOR, J. F.; GREEN, A. A. & CORI, G. T. — 1948 — Crystalline aldolase. *J. Biol. Chem.* 173:591.