HAMZA FAHMI ALI EL-DORRY

SUB - UNIDADES DA ALDOLASE DA FRUCTOSE - 1,6 - DIFOSFATO DE MÚSCULO ESTRIADO DE COELHO (E. C. 4.1.2.13)

Tese de Doutoramento apresentada
ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo

São Paulo
1972

a sawsan e a meus pais

AGRADECIMENTOS

O meu profundo reconhecimento ao Prof.Dr. Metry Bacila, pelo paciente e dedicado apoio, constante estímulo e valiosa orientação ao presente trabalho, à minha formação pós-graduada e à minha iniciação na carreira científica.

Ao Prof.Dr. José Moura Gonçalves, pela aquiescência em receber-me em seu laboratório, facultando-me a utilização da aparelhagem científica, além das profícuas discussões e sugestões sobre o presente trabalho.

Ao colega Dr. Dario Ocampos, pela significativa colaboração à realização desta tese.

Ao colega Dr. Omar Crivellaro, pela eficiente colaboração e dedicação durante as etapas do presente trabalho.

Sinceros agradecimentos à colaboração da Srta. Inês Imperatriz, na execução do presente trabalho.

Aos colegas Maria Eneida Aiello Sartori, Juarez Braz de Faria e Hélio Mauro Moreira Maia, pela ajuda nos trabalhos finais de elaboração desta tese.

À Srta. Olga Hatori, pela colaboração nos trabalhos de isoeletrofocalização.

À D. Fernanda I. Piochi, pela colaboração nos trabalhos finais desta tese;

Ao Eng. Hani Ghani, pela execução dos desenhos deste trabalho.

Ao Sr. Arnor Joaquim da Silva, pela colaboração nos serviços técnicos.

CONTEÚDO

		PÁG.
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Histórico	1
1.2.	Metalo-aldolase (Aldolases da Classe II) Distribuição e propriedades	2
1.3.	Aldolases formadoras de base de Schiff (Classe I).Distribuição e Propriedades	5
1.4.	Estrutura de sub-unidades de aldolase de músculo de coelho	11
1.4.1	Sub-unidades não idênticas e microetero geneidade	15
1.4.2.	Modificações da estrutura de aldolase "in vivo" e "in vitro"	18
1.5.	Objetivos do presente trabalho	20
2.	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1.	Material e procedimento	22
2.2.	Preparo do trocador iônico e das colunas de cromatografia	24
2.3.	Métodos analíticos	25
2.3.1.	Aldolase	25
2.3.2.	Determinação de proteína	26
2.3.3.	Unidades e atividade específica	26
2.4.	Eletroforese de zona	27
2.4.1.	Eletroforese em tiras de acetato de celulose	27
2.4.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	28
2.5.	Focalização isoelétrica	29
2.5.1.	Focalização isoelétrica em coluna de gradiente de densidade de sacarose	29
2.6.	S-carboxilação	32
3.	RESULTADOS	34
3.1.	Purificação de aldolase	34
3.1.1.	Extrato	34

PÁG.

3.1.2. Cromatografia em fosfocelulose em eluição com substrato 34
3.1.3. Cristalização 35
3.2. Homogeneidade das preparações de aldolase de músuclo de coelho 38
3.3. Resolução isoelétrica da aldolase de músculo de coelho 43
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de possíveis híbridos de aldolase de músculo de coelho separados por focalização isoelétrica 44
3.5. Resolução por focalização isoelétrica de aldolase de músculo de coelho sob condições de dissociação 52
3.6. A presença de sub-unidades de aldolase de músculo de coelho em diferentes idades 55
4. DISCUSSÃO 61
4.1. Purificação 61
4.2. Estudos de sub-unidades de aldolase de músculo de coelho 65
4.3. A presença de sub-unidades e 69
5. CONCLUSÕES 73
SUMÁRIO 75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76

ABREVIATURAS

AMC - Aldolase de músculo de coelho

DHAP - Dihidroxiacetona fosfato

EDTA - Etilenodiamino tetraacético, sal sódico

FDP - Fructose-1,6-difosfato

F1P - Fructose-1-fosfato

NAD - Nicotinamida-adenina-dinucleotídio

NADH - Nicotinamida-adenina-dinucleotídio forma reduzida

Tris - Tris(hidroxymethyl)-aminometano

TCA - Ácido tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Em 1907, FLETCHER e HOPKINS (1) demonstraram que ácido láctico era formado durante a contração muscular anaeróbica e removido na presença de oxigênio. Glicogênio muscular foi considerado fonte desse ácido láctico por MEYERHOF (2), que prosseguiu nas suas investigações sobre uma enzima que poderia catalisar a clivagem das hexoses, assim como a ressíntese da molécula de seis átomos de carbono a partir de precursores de três átomos de carbono. Foi sugerido por EMBDEN et al. (3) que hexose difosfato seria formada numa condensação entre diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído fosfato. MEYERHOF e LOHMAN (4) descobriram, em 1934, a clivagem reversiva da hexose difosfato para formar dois moles de diidroxiacetona fosfato, catalisada por uma enzima a que denominaram zimohexase (4). Posteriormente, aldolase substituiu a denominação inicial de zimohexase, visto que a enzima catalisaria a condensação reversível de diidroxiacetona fosfato com diversos aldeídos (5,6). MEYERHOF demonstrou ainda que a clivagem de FDP por aldolase originava um mole de diidroxiacetona fosfato e um mole de gliceraldeído-3-fosfato (7,8).

Aldolase foi cristalisada a partir de músculo de rato por WARBURG e CHRISTIAN (9). Processo simples de preparação de aldolase cristalina de músculo de coelho foi descrito por TAYLOR et al. (10), em 1948, fato que possibilitou a preparação da enzima em grande escala, facilitando ainda estudos posteriores sobre suas propriedades e mecanismos de reação. WARBURG e CHRISTIAN (9) isolaram também aldolase de levedura e mostraram que a enzima requeria um íon metálico para a sua atividade, enquanto que aldolase de músculo não era inibida por compostos que ligam esses íons metálicos.

Foi concluído, a partir desses estudos, e mais tarde confirmado por RUTTER (11) e GROVES e RUTTER (12), que há duas classes de aldolase da fructose difosfato (FDP-aldolase), cada uma apresentando propriedades catalíticas e características moleculares distintas. As enzimas possuidoras de propriedades semelhantes à aldolase de músculo de mamíferos foram agrupadas na Classe I, e aquelas cujas propriedades se assemelham às da aldolase de levedura foram agrupadas na Classe II.

1.2. Metalo-Aldolases (Aldolases da Classe II). Distribuição e Propriedades

A distinção importante entre as duas classes de aldolases consiste em que aldolase de levedura é

inibida reversívelmente por quelantes metálicos, enquanto que aldolase de músculo de coelho não apresenta tal inibição. A presença de zinco na aldolase purificada de *Aspergillus niger* (13) e de *Saccharomyces cerevisiae* (14,15) confirmou a possibilidade da ação de íon metálico nessas enzimas. Por outro lado, metais pesados não foram encontrados em quantidades significativas em aldolase de músculo (14,16,17).

Metalo-aldolases ou aldolases da Classe II são amplamente distribuídas em microrganismos, tendo sido encontradas em bactérias: *Escherichia* (18), *Lactobacillus* (19), *Brucella* (17), *Mycobacterium* (20), *Clostridium* (21), *Erwinia* (22), *Bacillus* (22), *Corynebacterium* (22), *Veillonella* (22) e *Pseudomonas* (22); em fungos: *Saccharomyces*(9, 14,15,23,24), *Candida* (25), *Aspergillus* (13) e *Penicillium* (22); e algas azuis-verdes, *Anacystis* (22). Aldolases da Classe I e da Classe II são encontradas em *Euglena* (26) e *Chlamydomonas* (22). Nesses dois últimos organismos, a biossíntese das duas diferentes classes de aldolase está sujeita a controles metabólicos e genéticos independentes (22,27).

As enzimas são completamente inibidas por quelantes metálicos, como EDTA, e essa inibição é totalmente revertida pela adição de íon metálico divalente,

considerado componente integral e essencial em cada uma das enzimas purificadas. Na maioria das vezes, o cofator é um íon de zinco firmemente ligado, mas as enzimas de Clostridium e de Anacystis foram consideradas portadoras de ferro ou cobalto frouxamente ligadas. O peso molecular dessas enzimas é de aproximadamente 70.000 daltons e aquelas suficientemente estudadas foram consideradas como compostas de duas sub-unidades. Pela técnica de eletrofocalização, que compreende separação de proteínas de pontos isoelétricos diferentes, por eletroforese num gradiente de pH, aldolase cristalina de levedura foi separada em três componentes principais (29). Essas formas múltiplas de aldolase de levedura (isoenzimas) são consistentes com uma conbinação ao acaso de duas subunidades diferentes em dímeros.

A atividade de metalo-aldolases demonstra normalmente um pH ótimo nítido e é estimulada por íons de potássio ou de amônio. Essas enzimas são indiferentes à ação de carboxipeptidase, mas fortemente inibidas por substâncias que reagem com grupos sulfidrílicos. Nessas propriedades como naquelas de especificidade do substrato e parâmetros cinéticos, as metalo-aldolases diferem das enzimas da Classe I que operam através da formação de base de Schiff. As metalo-aldolases são completa

mente inatingíveis por tratamento com boroidreto na presença de FDP ou de DHAP, enquanto que a base de Schiff formado~~ra~~ ~~de~~ enzima é irreversivelmente inativada por esse tratamento (22).

1.3. Aldolases Formadoras de Base de Schiff(Classe I). Distribuição e Propriedades

Aldolases formadoras de base de Schiff não contêm quantidades significativas de íon metálico pesado (9,14,16) e não são inibidas por reagentes quelantes de metais (9,22,26). FDP-aldolase da Classe I é encontrada ao lado de metalo-aldolase em Euglena e Chlamydomonas. Tal enzima é largamente distribuída entre protozoários e algas verdes e em plantas superiores e animais(22, 26,30).

Estudos de distribuição de FDP-aldolase em sistemas biológicos foram levados a efeito por LEBHERZ e RUTTER (34). Três FDP-aldolases fundamentais denominadas A, B e C foram encontradas em tecidos de 13 espécies de vertebrados testadas, usando-se mobilidades eletroforéticas relativas, especificidade de substratos (relação FDP/F-1-P) e propriedades imunológicas específicas. Aldolase A foi encontrada na maior parte dos tecidos examinados; aldolase B foi observada em fígado e rim;

aldolase C foi localizada em cérebro e com variações em coração e baço. A relação FDP/F-1-P de todas as atividades musculares é alta (44-60/1), característica da aldolase A. Todas as relações de atividade de aldolase hepática são baixas (1,2-3,5), sugerindo alta concentração de aldolase B, enquanto que aldolase de cérebro (aldolase C) apresenta uma relação FDP/F-1-P de 10/1.

Aldolase da Classe I foi obtida em forma altamente purificada em grande variedade de animais e plantas. A enzima procedente de tecidos de mamíferos mostra propriedades moleculares e catalíticas similares àquelas de aldolases de coelho. Os pesos moleculares já determinados são de cerca de 160.000, enquanto que sub-unidades dissociadas apresentam pesos moleculares próximos a 40.000, dando apoio assim à estrutura tetramérica dessas enzimas. Aldolases purificadas de músculo e de fígado de rato diferem na composição de aminoácidos e nos mapas peptídicos obtidos por digestão tríptica (31).

As relações de atividade FDP/F-1-P de aldolase em tecidos de rato variam de aproximadamente 1, para fígado e rim, a um valor consideravelmente alto, de cerca de 100 para músculo (32).

Relações intermediárias de atividade para tecidos como cérebro e testículo sugerem a presença de

várias isoenzimas aldolásicas nesses tecidos: esse fato é confirmado pelos padrões obtidos em eletroforese em gel de amido ou em acetato de celulose. Híbridos do tipo A e B estão presentes em rim e fígado de rato, enquanto híbridos do tipo A e C foram encontrados em outros tecidos, inclusive em músculo. O intestino delgado de rato continha somente aldolase B.

Músculo de bovino contém somente aldolase A, com uma relação de atividade de cerca de 50. A relação correspondente para aldolase C de cérebro de bovino foi de 12, com valores intermediários para híbridos, separados por cromatografia preparativa (33).

Relações diferentes de atividade foram descritas para híbridos A e C em cérebro de cobaia (35). Digestão com carboxipeptidase reduziu a atividade de aldolase C de cérebro de bovino em relação à FDP para aproximadamente 5% do seu valor original (33), sem afetar a atividade em relação à F-1-P. O fato é válido para aldolase A de músculo de rato: contudo, liberação de tirosina de aldolase de fígado de rato não afetou as atividades para esses dois substratos, e a relação de atividade FDP/F-1-P permaneceu próxima de 1,0 (14).

Aldolases de fígado e de músculo de rato diferem ainda quanto à susceptibilidade à inativação por

gliceraldeido-3-fosfato. Da mesma forma que aldolase A de coelho, aldolase de músculo de rato é rapidamente inativada em incubação com substrato aldeídico; em contraste, aldolase de fígado é completamente resistente (36).

Aldolase A e C de galinha foram isoladas em sua forma cristalina (37,38). As propriedades dessas enzimas são semelhantes às aldolases de músculo de coelho correspondentes, embora imunologicamente distintas e diferentes na composição de aminoácidos (37,38,39).

Aldolases de coração de bovino (40) e de coelho (41) foram isoladas na sua forma cristalina. As propriedades dessas enzimas são semelhantes às aldolases de músculo de coelho correspondentes, embora mapas peptídicos de aldolases de coração de bovino sejam diferentes daqueles de aldolase de músculo de coelho. Entretanto, mapas peptídicos de aldolases de coração e de músculo de coelho são semelhantes.

Aldolases isoladas de músculo de vertebrados inferiores são semelhantes à aldolase A de músculo de mamífero na estrutura molecular e nas propriedades catalíticas. Aldolases isoladas de músculo de bacalhau (42) e de músculo de rã (43) apresentam peso molecular próximo a 160.000, contendo cada uma delas quatro sub-unidades. A relação de atividade FDP/F-1-P é de 75/1 para a

enzima de bacalhau, reduzida para aproximadamente 1 na digestão com carboxipeptidase. Contudo, a estrutura COOH-terminal parece diferir daquela da aldolase de músculo de coelho, principalmente pela ausência de resíduo de histidina na terceira posição a partir de aminoácido terminal. Aldolase de músculo de rã é uma aldolase singular no sentido de possuir somente um resíduo de metionina por sub-unidade, constrastando com os valores de 3 para aldolase de músculo de coelho (44), 5 para aldolase de músculo de lagosta (45), 6 para aldolase de músculo de esturjão (46), 4 para aldolase de músculo de galinha e de pombo (47) e 8 para aldolase de músculo de bacalhau (42). Em fígado de mamíferos, o número de resíduos de metionina por sub-unidade é de cerca de 6 (14,48). Aldolase C de cérebro de coelho, como também aldolase A, contêm três resíduos de metionina por sub-unidade (49).

Aldolases purificadas de invertebrados mostram algumas propriedades que se assemelham às das aldolases de outras fontes animais. Aldolase cristalizada de Drosophila pupas (50) mostra relação de atividade intermediária com FDP e F-1-P de 10-15 (51) e um peso molecular de cerca de 120-130.000. A remoção de resíduos de tirosina COOH-terminal causa decréscimos de atividade em relação a FDP e F-1-P de 95% e 65%, respectivamente. Aldolase cristalizada de músculo de lagosta (45) apresenta peso

molecular de 160.000, como o de aldolase de mamíferos, e a mesma estrutura tetramérica, com 4 equivalentes de tirosina por mole liberada por carboxipeptidase. Diferentemente de aldolases de mamíferos, contudo, a perda de atividade em relação a FDP não corre paralelamente à remoção dos resíduos de tirosina, mas foi reduzida a 70% quando menos da metade da tirosina foi removida. Perda de atividade em relação a F-1-P foi observada somente durante liberação dos dois últimos resíduos de tirosina.

A estrutura de aldolases de plantas é também semelhante à de enzimas de mamíferos, com exceção de que o peso molecular é inferior. Para aldolase de folha de espinafre, o valor é de 120.000 e o peso molecular das sub-unidades foi estimado em 28.000-30.000 (52). A relação de atividade de FDP para F-1-P é de aproximadamente 20, e ambas as atividades são diminuídas durante a remoção dos resíduos de tirosina COOH- terminal com carboxipeptidase (53). Contudo, os quatro resíduos de tirosina não são igualmente sensíveis à carboxipeptidase, e perda de atividade em relação à FDP é associada com a remoção de um ou dois resíduos dos mais sensíveis (52). Esse fato sugere uma interação cooperativa entre as sub-unidades, como no caso de aldolase de lagosta.

Aldolase pode ser associada com cloroplastos na folha intacta de espinafre. BROOKS e CRIDDLE(54) isolaram a enzima a partir de cloroplastos de espinafre e HATZ e LEUTHARDT (55) comunicaram que ela está localizada no estroma do cloroplasto. Algas azuis-verdes foram consideradas como contendo aldolases da Classe I e da Classe II (22), mas a sua localização nas partículas celulares ou frações de sobrenadante não foram ainda estabelecidas.

1.4. Estrutura de Sub-Unidades de Aldolase de Músculo de Coelho

A estrutura de sub-unidades de aldolase tem sido investigada, ultimamente, por várias técnicas, notando-se uma evidência de estrutura tetramérica baseada em dois pares de sub-unidades não idênticas.

Os primeiros resultados obtidos sugerindo modelo de três sub-unidades foram baseados em resíduos de três tirosinas carboxi-terminais por mole (considerando se 150.000 g de proteína por mole) (56,57). Resultados semelhantes foram encontrados para aldolases A e B (58,59, 60) com três prolinas N-terminais por mole (61,62). Os primeiros resultados experimentais sugerem somente um sítio de ligação do substrato por molécula (16,63), mas

investigações mais recentes sugeriram três sítios de ligação para fructose-difosfato (64) e arabinitol difosfato (65).

KOBASHI et al. (66) demonstraram três moles de ligação de diidroxiacetona fosfato na presença de boroidreto de sódio,

DEAL et al. (67), STELLWAGEN e SCHACHMAN (68) e SCHACHMAN e EDELSTEIN (69) verificaram que aldolase A nativa (peso molecular 142.000-150.000) é reversivelmente dissociada em ácido, detergentes, uréia ou guanidina numa forma com aparentemente 1/3 do peso molecular da molécula original. Os resultados de experimentos em que a enzima era dissociada sob condições básicas sugeriram inicialmente a presença de unidades ainda menores (aproximadamente 1/6 da massa da molécula nativa) (70), mas experimentos subsequentes indicaram que a degradação parcial da enzima ocorria sob essas condições, e quando a degradação era mínima em experimentos semelhantes levados a efeito, dissociação da molécula nativa para aproximadamente 1/3 do peso molecular original foi observado (61).

O modelo de 3 sub-unidades foi investigado através de estudos de ultracentrifugação de KAWAHARA e TANFORD (72), que demonstraram que aldolase nativa com peso molecular de 160.000 (comparado com 142.000, 150.000

obtidos nos outros estudos já mencionados), era dissociada em unidades de 40.000 por tratamento com cloridrato de guanidina. Estudos de ultracentrifugação levados a efeito por SIA e HORECKER (73) confirmam este resultado.

A estrutura tetramérica foi reforçada pelo experimento de hibridização usando aldolase de cérebro e de músculo (75,76) por dissociação e reassociação reversíveis de misturas binárias de aldolase A e C. Quando aldolase A e C puras foram acidificadas a pH 2,0 a 0°C, e as misturas deixadas em repouso por 30 minutos e então o pH ajustado para 7,5, cinco sítios de aldolase foram evidenciados por eletroforese de zona usando-se processos de coloração específicos para evidenciação da atividade da enzima ou por resolução cromatográfica numa coluna de DEAE-Sephadex. Dissociação reversível de cada híbrido produz todos os 5 conjuntos de híbridos A-C, mas dissociação reversível de aldolase A ou C, por outro lado, produz somente as aldolases fundamentais A ou C, respectivamente. Se os conjuntos de híbridos A-C são submetidos à eletroforese em gel de amido sob condições não-dissociativas, resolução típica dos 5 conjuntos de híbrido A-C é obtida, com padrões regularmente ordenados de mobilidade de aldolase A para aldolase C. Um padrão

completamente diverso é obtido em eletroforese de zona sob condições de dissociação acídica. As sub-unidades de aldolase A e C migram como faixas singulares distintas. No primeiro híbrido, as sub-unidades de aldolase A predominaram; no segundo híbrido, aproximadamente quantidades iguais de sub-unidades de aldolase A e C estavam presentes; no terceiro híbrido, sub-unidades de aldolase C estavam presentes em concentrações mais altas. Esse resultado foi confirmado por dissociação e reassociação de $|^3H|$ leucil-aldolase A de rato e aldolase C não marcada de coelho, que produzem um típico conjunto de 5 membros. Cada um dos membros foi isolado, a radioatividade relativa específica sendo aproximadamente igual a 1, 0,75, 0,5 0,25 e 0 para aldolase A, híbridos 1-3 e aldolase C, respectivamente.

A partir dos dados obtidos na hibridização, é difícil a correspondência com o modelo de 3 cadeias da enzima. Mistura binária de trímeros compostos de 3 sub-unidades idênticas produziria quatro conjuntos de híbridos ($\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\beta\beta$, $\beta\beta\beta$; se α= sub-unidades A, e β= sub-unidades C). Combinações binárias de três sub-unidades da molécula contendo 2 sub-unidades diferentes produziria um conjunto de híbridos de seis membros ($\alpha\alpha\alpha'$, $\alpha\alpha\beta'$, $\alpha\beta\beta'$, $\alpha\beta\alpha'$, $\beta\beta\alpha'$, $\beta\beta\beta$, considerando-se que a sub-unidade diferente está presente somente na molécula). Em contraste com o

modelo de três cadeias, mistura binária de moléculas tetraméricas deveria produzir conjunto de seis membros (α_4, $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$ e β_4, considerando a molécula tetramérica de aldolase A e C como sendo composta de sub-unidades idênticas).

Fato significativo para a estrutura de 4 sub-unidades foi obtido quando LAI (44) separou os quatro peptídios formados por clivagem com brometo de cianogênio. Filtração dos produtos da clivagem por coluna de Sephadex G-75 separavam a mistura em 4 picos distintos. Esse resultado confirmou a estrutura de 4 sub-unidades de aldolase de músculo de coelho, já que se sabia que a proteína contém 12 resíduos de metionina e o isolamento de 4 peptídios foi consistente com 3 por cadeia de peptídios.

Resultado que confirmou a estrutura de 4 sub-unidades foi obtido por estudos de micrografia eletrônica de aldolase A, B e C, sugerindo que essa enzima contém 4 sub-unidades (59,78).

1.4.1. Sub-unidades não idênticas e microeterogeneidade

Evidência para a presença de sub-unidades não idênticas em AMC provém originalmente da observação de que 2 equivalentes de alanina, comparados com 3 de tirosi

rosina, eram liberados por tratamento com carboxipeptidase (56,57,59).

Esse fato foi confirmado por WINSTEAD e WOLD (57) que também observaram que menor quantidade de histidina, em comparação com tirosina, era liberada na digestão prolongada com carboxipeptidase.

Duas sub-unidades não idênticas foram separadas por cromatografia na presença de uréia 8M por CHAN et al. (79) e foi confirmado que elas são distintas quanto à sua susceptibilidade para a carboxipeptidase. A digestão das cadeias α resultou na liberação de tirosina, alanina e histidina, pela ordem; a digestão cadeias β também resultou na liberação de tirosina, mas alanina era liberada bem mais vagarosamente e histidina não foi encontrada, mesmo após tratamento prolongado com altas concentrações de carboxipeptidase. Após exposição da enzima S-carboximetilada à uréia, 4 equivalentes de tirosina, mas somente dois de histidina, foram liberados por carboxipeptidase em 80 horas (80), confirmando a estrutura de 4 sub-unidades e também a presença de sub-unidades não idênticas.

Embora as sub-unidades α e β estejam presentes em quantidades quase iguais, a enzima não aparenta possuir uma estrutura obrigatória $\alpha_2\beta_2$ Aldolase na-

tiva, isolada de músculo de coelhos adultos, demonstrou conter mistura de 5 formas que podem ser separadas por focalização isoelétrica (29,81). Foi sugerido que essa microeterogeneidade é o resultado da associação ao acaso de cadeias α e β em tetrâmeros contendo proporções variáveis de dois tipos de sub-unidades.

A presença de sub-unidades não idênticas foi evidenciada em aldolases de músculo de várias espécies, usando-se a técnica de eletroforese em uréia desenvolvida por CHAN et al. (79) e ANDERSON et al. (46) demonstraram a presença de duas faixas de peptídios em aldolases de bovino, de porco e de músculo de coelho, porém não em músculo de esturjão.

Evidência para microeterogeneidade foi demonstrada também para aldolase de cérebro (29) e em hepatoma (82), mas não para aldolase isolada de fígado normal de rato.

Há já informações (81) sobre a sequência do peptídio NH_2 terminal para aldolases de músculo. Por outro lado, estudos de LAI et al. (83) mostram a sequência de aminoácidos da extremidade carboxi-terminal da cadeia peptídica. Este último fato proporciona a única diferença estrutural conhecida para as cadeias α e β e uma

possível explicação para a microeterogeneidade verificada com essa proteína enzimática. Dois hexapeptídios carboxi terminais foram isolados e se revelaram distintos entre si por um único resíduo de aminoácido:

Ile-Ser-Asn-His-Ala-Tyr (Cadeia α)
Ile-Ser-Asp-His-Ala-Tyr (Cadeia β)

As diferenças de comportamento durante a digestão com carboxipeptidase foram esclarecidas quando foi demonstrado que enquanto a ligação Asn-His é rapidamente hidrolisada por essa enzima, a ligação Asp-His é muito resistente à hidrólise.

1.4.2. Modificações da estrutura de aldolase "in vivo" e "in vitro

Duas modificações específicas em AMC parecem ocorrer no animal vivo, Uma relaciona-se à origem da sub-unidade β, possivelmente pela modificação de sub-unidades α (84), e outra à presença de pequenas quantidades de fósforo orgânico na proteína enzimática cristalina(66).

Aldolase preparada de músculo de coelhos até três meses de idade apresenta somente traços de sub-unidades β . Essas aparecem quando os coelhos atingem de 3 a 5 meses de idade e passam para a idade adulta, na qual quantidades quase iguais das cadeias αe β são observadas

(85). KOIDA et al. (85) concluiram de estudos das sub-unidades separadas que as diferenças moleculares estavam presentes na região próxima à carboxi-terminal, o que foi confirmado pela reposição de um resíduo de asparagina por ácido aspártico (84). A análise sequencial não evidenciou outras diferenças nas cadeias α e β (44,87). O aparecimento de sub-unidades em AMC depois de 3 meses, e sua presença em tumores, mas não em aldolase de fígado, sugere que essa modificação possa estar relacionada à alta atividade de aldolase A com FDP.

Ao lado da microheterogeneidade representada pela presença de cadeias α e β, um segundo tipo de modificação é indicado pela resistência de aproximadamente um dos quatro resíduos de tirosina à carboxipeptidase (57,58). Há possibilidade de que esse fato possa estar relacionado à presença de fósforo orgânico na molécula (66). ADELMAN et al. (88) indicaram que a inforporação de gliceraldeido-3-fosfato (possivelmente ao sítio de ligação para o grupo 6-fosfato de FDP) possibilita à tirosina carboxi-terminal tornar-se mais resistente à carboxipeptidase. WOODFIN estudou inativação de aldolase em presença da FDP (89), mas o efeito de tirosinas carboxi-terminais não foi testado.

As modificações de aldolase <u>in vivo</u> e por incubação com substratos podem ser relacionadas ao

"turnover" da enzima em músculo de coelho (90,91). A velocidade do "turnover" foi considerada como de 2-3 semanas em músculo de coelho (90) e cerca de 15 dias em fígado de rato (92).

1.5. Objetivos do Presente Trabalho

Verifica-se, pelo relato apresentado, que muitos aspectos ligados à estrutura e função da aldolase de músculo de coelho são já conhecidos. Entretanto, vários problemas merecem ainda ser examinados, mormente no que diz respeito à natureza das sub-unidades que constituem a referida proteína.

Assim, para analisar alguns dos seus aspectos, os seguintes tópicos foram estudados.

1.5.1. Purificação da aldolase de músculo de coelho com o mínimo de heterogeneidade, já que o isolamento e a cristalização da enzima, pelo emprego do sulfato de amônio, pode explicar muito da heterogeneidade observada que resultaria de degradação ou de modificações ocorridas durante aquele processo.

1.5.2. A presença de duas sub-unidades não idênticas em aldolase de músculo de coelho origina várias questões a propósito de experimentos de hibridização entre

aldolases A e C. Os cinco híbridos formados após dissociação e reassociação entre aldolases A e C, na presença de duas sub-unidades não idênticas, teria que ser consideravelmente maior do que o número que foi detectado.

1.5.3. O aparecimento de sub-unidades α e β de aldolase de músculo de coelho durante o crescimento do animal é assunto de interesse, já que, presumivelmente, a sub-unidade β se origina de modificações da sub-unidade α, mas a idade do animal na qual a sub-unidade β atinge o máximo é aparentemente controversa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material e Procedimento

Músculo de coelho foi removido logo após o abate de animais de várias idades obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou de frigoríficos. A não ser quando indicado, todas as operações de purificação foram levadas a efeito à temperatura de 4°C.

Fructose-1,6-difosfato utilizada no presente trabalho era sal tetrassódico, obtido da Sigma Chemical Company, E.U.A. Desidrogenase de gliceraldeido-3-fosfato e mistura de desidrogenase cristalina de α-glicerofosfato e triosefosfato isomerase (10 mg/ml) foram também obtidas da Sigma Chemical Company, E.U.A. NADH e NAD utilizados foram fornecidos pela Boehringer Manheim Co., Alemanha.

Fosfocelulose em pó Whatman (P11), trocador catiônico, com capacidade de 7,4 mg/g foi obtido de Reeve Angel, E.U.A. Uréia foi obtida da Fischer Scientific Company e recristalizada a partir de etanol 95%, aquecido.

β-Mercaptoetanol, Tris (hidrometil)-aminometano e Na_2ASO_4 foram obtidos da E. Merck Company. EDTA foi obtido da Baker's, Produtos Químicos, São Paulo.

Fenazina metossulfato e cloreto de nitrotetrazólio azul foram obtidos da Sigma Chemical Company, E.U.A.

O sistema de eletrofocalização 8100-10 (coluna de 110 ml) e Ampholine foram obtidos da LKB Instruments, Bromma, Suécia.

Ampholine é mistura de grande número de diferentes ácidos poliamino-policarboxílicos alifáticos de peso molecular abaixo de 1.000, cobrindo faixa de pH de 3-10 e preparados pela LKB Instruments, Bromma, Suécia. As soluções originais são fornecidas na concentração de 40 por cento, sendo diluídas, de modo conveniente, para o uso.

Para determinações espectrofotométricas, foi utilizado um espectrofotômetro Gilford com registro automático ligado a um monocromador Beckmann DU. O instrumento foi ligado a um banho de circulação de água para manter temperatura constante na câmara de cubetas que se encontrava ligada a um sistema automático de troca.

Todas as operações de centrifugação foram levadas a efeito a 0-4°C em centrífuga refrigerada Sorvall modelo RCB2 e as de cromatografia de coluna em câmara fria a 4°C.

2.2. Preparo do Trocador Iônico e das Colunas de Cromatografia

Trocador catiônico de fosfo-celulose Whatmann em pó (P11) foi usado e preparado de acordo com PETERSON e SOBER (93).

Fosfo-celulose foi suspensa em água destilada e agitada durante a noite, as partículas finas sendo removidas por repetidas decantações. O resíduo de fosfo-celulose foi lavado de modo sucessivo, com NaOH 0,5 M, o excesso de NaOH sendo removido por lavagem com água destilada e a seguir com solução 0,5 M de HCl. Após remover o excesso de HCl com água destilada, o material foi suspenso em água e o pH ajustado a 7,5 com Tris (OH) 2 M. A suspensão foi diluída a uma concentração final de Tris, 0,05 M e finalmente lavada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM e β-mercaptoetanol 10^{-3}M, até que o equilíbrio tenha sido obtido. A suspensão de fosfocelulose assim obtida foi mantida a 4°C.

Para preparar as colunas de fosfocelulose, o líquído sobrenadante foi decantado da suspensão estoque do trocador iônico à temperatura ambiente. A celulose foi, então, suspensa no tampão utilizado como eluente no início da operação. Para a operação de cromatografia, usou-se coluna de vidro adaptada com disco poroso na parte inferior e aparelhada com funil de vidro na parte superior ajustado por meio de junta esmerilhada. À coluna, previamente adicionada de tampão até o terço inferior, foi feita transferência única do trocador iônico. Deixou-se a suspensão sedimentar por gravidade por tempo suficiente (cerca de 5 minutos) e a saída foi aberta. A coluna foi, então, removida para a câmara fria e conectada com o reservatório contendo o tampão a ser utilizado como eluente, sendo que pelo menos 2 volumes desse mesmo tampão foram passados por ela durante cerca de 12 horas.

2.3. Métodos Analíticos

2.3.1. Aldolase

A atividade de aldolase foi medida de acordo com o método de BLOSTEIN e RUTTER (28) a 25°C em 1,0 ml de meio de reação constituído por solução tampão de Tris-HCl (100 mM) e NADH (0,1 mM) e de FDP (1 mM) e

de uma mistura contendo 10 μg de triosefosfato isomerase e 10 μg de α-glicerofosfato desidrogenase. Diluição apropriada de enzima foi adicionada ao meio a fim de iniciar a reação que foi então seguida pela medida da diminuição de absorbância a 340 nm com passagem de luz de 1 cm no espectrofotômetro registrador Gilford. Os cálculos feitos foram baseados no coeficiente de extinção molar de piridinonucleotídio reduzido de $6,22 \times 10^3$.

2.3.2. Determinação de proteína

Ao longo das experiências de purificação, a proteína foi determinada pelo método turbidimétrico de BÜCHER (74) (mg proteína/ml = absorbância 340 nm x 0,33).

Concentração proteica das frações purificadas foi determinada pela absorbância a 280 nm de amostras em solução de NaOH 0,1 N usando o coeficiente de extinção molar de 0,91 (91) para uma solução de 1mg/ml de aldolase em uma cubeta com passo de luz de 1 cm ($E^{0,10}_{1\ cm}$=0,91), de modo que mg aldolase/ml = A280 nm/0,91.

2.3.3. Unidades e atividade específica

Uma unidade de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir mudança de uma unidade de absorbância a 25°C sob as condições de medida de atividade indicadas.

Em termos de unidades internacionais, uma unidade de aldolase é definida como o número de μmoles de FDP utilizados por minuto a 25°C, sob as condições de medida de atividade indicadas.

Atividade específica foi definida como sendo unidades de enzima por mg de proteína.

2.4. Eletroforese de Zona

2.4.1 Eletroforese em tiras de acetato de celulose

Eletroforese em tiras de acetato de celulose e coloração a partir da atividade da aldolase em agar foi levada a efeito em tampão barbital 0,06 M, contendo β-mercaptoetanol 0,01 M, pH 8,6, em tiras de acetato de celulose (75) a 250 v por 90 minutos.

As tiras de acetato de celulose foram coloridas com a finalidade de localizar a atividade de aldolase segundo o método de PENHOET et al. (75).

A placas de Petri foram transferidos 4 ml de uma solução de agar Nobel a 0,5% em solução de arseniato de sódio 0,01 M, pH 7,5, contendo fructose-1,6-difosfato 0,01 M, NAD 0,01 M, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 0,12 mg/ml, fenazina metossulfato 0,024 mg/ml e cloreto de nitrotetrazólio azul. A transferência

do material para as placas de Petri foi feita a partir de solução a 42°C, deixando-se solidificar a 4°C. Após eletroforese, as tiras de acetato de celulose foram colocadas nessa solução de agar e incubadas a 37°C por 10-20 minutos, a fim de permitir o desenvolvimento da cor.

2.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi levada a efeito de acordo com a técnica de DAVIS (77).Reagentes e aparelhos foram obtidos da Canalco (Canal Industrial Corporation, Bethesda, Maryland). Géis em uréia 8 M foram preparados através da adição de uréia recentemente recristalizada em quantidades indicadas às várias soluções, imediatamente antes da etapa de polimerização. A concentração final do monômero era de 3-5%. Uréia não foi adicionada ao tampão eletrolítico (Tris-tampão glicina, pH 8,5). Os volumes eram de 0,9 ml para o gel de separação. Proteínas carboximetiladas foram adicionadas dissolvidas em uréia 8 M.

Eletroforese foi levada a efeito a 2 mA por tubo até que o corante marcador (azul de bromofenol) atingisse a porção inferior da coluna de gel. Proteínas foram identificadas por coloração com negro de anilina.

2.5. Focalização Isoelétrica

2.5.1. Focalização isoelétrica em coluna de gradiente de densidade de sacarose

A resolução isoelétrica de aldolase de músculo de coelho foi levada a efeito numa coluna de vidro vertical obtida da LKB Instruments, Bromma, Suécia. A capacidade da coluna de Ampholine usada era de 110 ml, também obtida da LKB Instruments, Bromma, Suécia.

A coluna utilizada para focalização isoelétrica era cuidadosamente limpa antes de cada corrida, usando-se detergente apropriado para remoção de proteína. A coluna foi montada em posição absolutamente vertical num suporte.

Solução utilizada no catódio foi preparada dissolvendo-se 0,3 g de hidróxido de sódio e 18 g de sacarose em 21 ml de água desionizada e transferida para a porção inferior da coluna através de bomba peristáltica Vario-Perpex, modelo 10.200, da LKB Instruments, Bromma, Suécia. A saída da coluna foi aberta para remoção de bolhas de ar. O menisco da solução densa do eletródio foi colocado até 1,6 cm acima da extremidade inferior do tubo central do eletródio.

Solução densa de sacarose (solução A) foi preparada dissolvendo-se 3,75 ml da solução estoque a 40%

do transportador anfolítico, pH 7-10, em 42 ml de água desionizada. A esta última solução foram adicionadas 28g de sacarose e a solução final obtida por diluição total do sistema até 60 ml.

Solução mais diluída de sacarose (solução B) foi preparada por diluição de 1,25 ml da solução estoque de Ampholine até 60 ml com água desionizada. A concentração final de Ampholine na coluna é de cerca de 2%. A cada uma das soluções adicionou-se 0,035 ml de β-mercaptoetanol para dar concentração final de 10^{-2}M.

O gradiente de densidade foi preparado e transferido para a coluna por um misturador de gradiente, colocando-se a solução B (55 ml) num frasco e a solução A (55 ml) num segundo frasco que era ligado a uma bomba peristáltica e o tubo de saída inserido no compartimento de eletrofocalização. O misturador de gradiente foi ligado e a velocidade de fluxo não ultrapassou a 4 ml/min.

Quando a solução atingiu 2 cm abaixo do eletródio superior, a solução B foi transferida para o compartimento de eletrofocalização por meio de bomba peristáltica, até que o menisco da solução do eletródio atingisse 1 cm acima do eletródio superior.

A solução de proteína (não mais de 5 ml) contendo de 10 a 25 mg foi adicionada à solução A do misturador de gradiente quando cerca de metade do gradiente havia sido formado.

A coluna foi resfriada com água circulante a 4°C, a não ser quando indicado, e foi conectada com fonte de energia com o polo negativo na extremidade inferior da coluna (solução do catódio) e o polo positivo na extremidade superior da coluna (solução do anódio).

A voltagem foi aumentada para 800 volts por um período de 16 horas, com máximo de 2-3W no início, e mantida em equilíbrio de 24 a 30 horas, a não ser quando indicado.

Depois que a estabilização da corrente foi atingida, a fonte de energia foi desligada e a solução do anódio foi aspirada a fim de diminuir o risco de ser ela misturada com o efluente durante o processo de esvaziamento. Nesse momento, a coluna é aberta e esvaziada por meio de uma bomba a uma velocidade de fluxo não maior do que 1-2 ml/min. Frações de 1-2 ml eram coletadas e a sua concentração hidrogeniônica medida em potenciômetro EIL com escala expandida, imediatamente após a sua remoção da coluna.

2.6. S-Carboximetilação

Redução e S-carboximetilação da AMC cristalina foram levadas a efeito de acordo com as condições descritas por CRESTFIELD et al. (86). Uréia recristalizada foi dissolvida com tampão Tris 2,0 M, pH 8,5, contendo 100 mM de EDTA. Quando o sistema se completou, a concentração final de uréia era de 8 M e a de Tris de 0,3 a 0,4 M. Nitrogênio contendo máximo de 5 ppm de oxigênio (Nitrogênio U fornecido pela Oxigênio do Brasil, São Paulo) foi borbulhado através da solução por 15 minutos e a solução de proteína foi, então, adicionada ao sistema para atingir uma concentração final de 1-5 mg/ml. Excesso de β-mercaptoetanol (50 vezes mais em relação a aproximadamente 30 resíduos de cisteína por molécula de aldolase) foi adicionado ao sistema. À superfície do sistema foi então aplicado nitrogênio por 10 minutos, após o que adicionou-se a ela uma fina camada de uréia 4 M, tendo o tubo sido então recoberto totalmente com papel de alumínio e a redução levada a efeito por 2 horas a 20°C, no escuro.

Ácido monoiodoacético recristalizado (268 mg) foi dissolvido em 1 ml de NaOH N (pH final 8,5) e adicionado ao sistema de reação em volume de cerca de 10 vezes menor daquele do β-mercaptoetanol adicionado ao

sistema. A mistura de reação foi agitada com agitador magnético por 15 minutos a 20°C, e então β-mercaptoetanol (equivalente molar ao do ácido monoiodoacético existente na mistura de reação) foi adicionado para reagir com o monoiodoacetato residual. A uréia foi, então, removida por diálise contra água destilada contendo 0,01% de β-mercaptoetanol e 1,0% de ácido acético. A operação de diálise foi levada a efeito por 12 horas ao final de cujo tempo a proteína S-carboximetilada foi coletada por precipitação com TCA na presença de 0,05 ml de solução 3 M de TCA por ml da mistura de reação. Após coletar o precipitado por centrifugação, foi ele lavado duas vezes com acetona, duas vezes com éter e finalmente seco.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação de Aldolase

3.1.1. Extrato

Músculo esquelético (132 g) de coelho foi removido logo após abate do animal, mantido em gelo e moído em máquina de moer carne. O músculo moído foi então suspenso em 2 volumes (v/w) de tampão Tris-HCl 0,05 M, contendo EDTA 0,001 M e β-mercaptoetanol 0,001 M, pH 7,5. A suspensão foi homogeneizada num liquidificador comum a baixa velocidade por 60 segundos e depois centrifugada a 15.000 r.p.m. por 1 hora; foi então passada por várias camadas de gase para remover partículas de gordura e o resíduo foi desprezado (extrato 220 ml).

3.1.2. Cromatografia em fosfocelulose em eluição com substrato

Extrato (220 ml, 4730 mg de proteína, atividade específica = 2,8) foi introduzido em coluna de fosfocelulose (3,0 x 40 cm) preparada de acordo com a descrição apresentada em Material e Métodos, e equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 0,001 M e β-mercaptoetanol 0,001 M, pH 7,5. Procedeu-se à cromatografia se-

gundo as indicações de POGELL (97). A coluna foi lavada inicialmente com tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 0,001 M e β-mercaptoetanol 0,001 M, pH 7,5, numa velocidade de fluxo de 0,7 ml por minuto, até que não se verificasse mais eluição da proteína A partir daí, aldolase foi eluída da coluna com o mesmo tampão contendo frutose-1,6-difosfato 25 mM. Frações de 9 ml foram obtidas na mesma velocidade de fluxo, para análise de atividade enzimática. A enzima foi recuperada no efluente entre 70 a 155 ml depois da troca de tampão. As frações foram então combinadas (cromatografia em fosfocelulose e com eluição do substrato) dando volume total de 85 ml. Perfil de eluição da enzima em fosfocelulose é mostrado na Figura 1.

3.1.3. Cristalização.

A fração obtida da cromatografia em fosfocelulose, contendo de 5 a 10 mg de proteína por ml, foi dialisada contra solução de sulfato de amônio a 50% em tampão Tris-HCl, 0,025 M, adicionada de EDTA, 0,001 M e de β-mercaptoetanol, 0,001 M, pH final 7,5. Cristais formados durante cerca de 12 horas de diálise foram coletados por centrifugação a 15.000 r.p.m. por 15 minutos e conservados em suspensão em solução de sulfato de amônio a 50%.

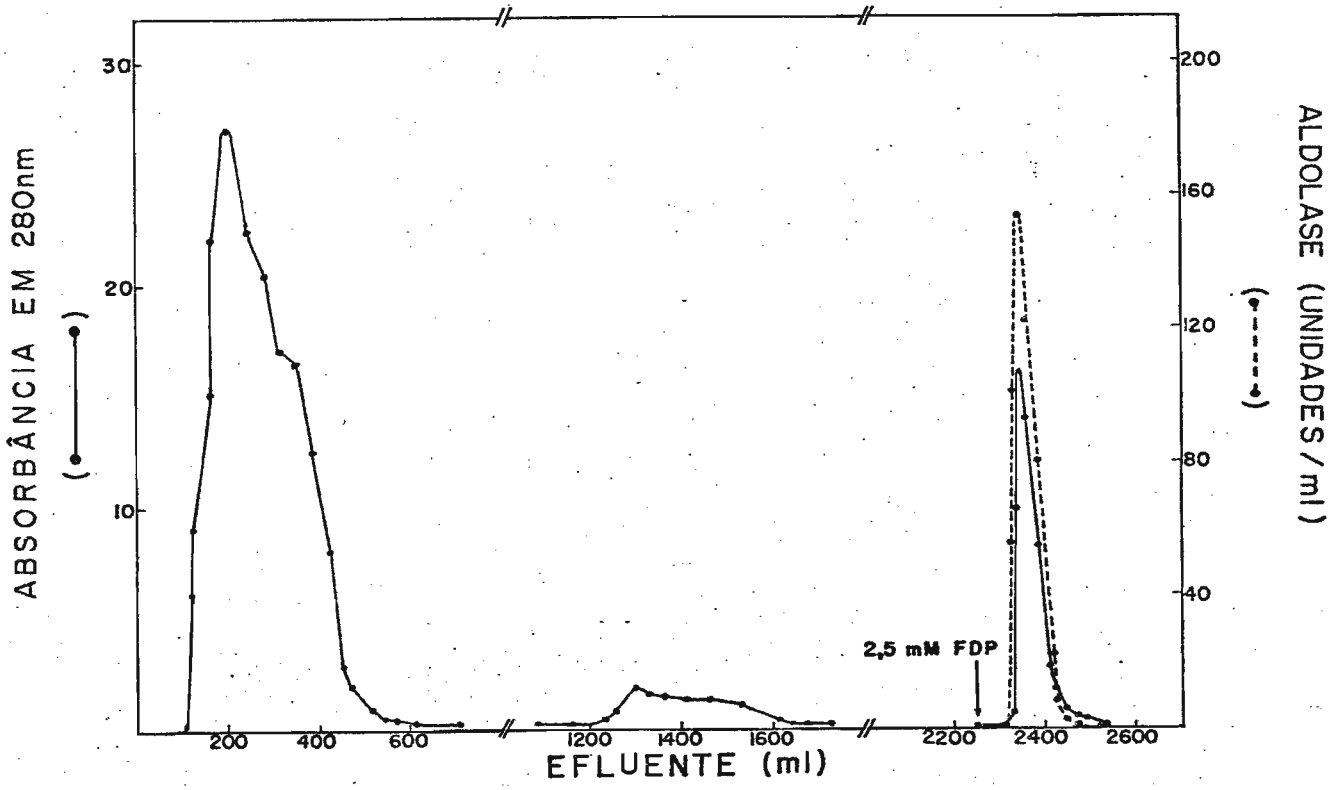

FIGURA 1 - Eluição com substrato de aldolase de músculo de coelho em fosfocelulose.

FIGURA 1 - Eluição com substrato de aldolase de músculo de coelho em fosfocelulose. Fosfocelulose foi preparada segundo descrição apresentada em Material e Métodos. O extrato (220 ml; 4730 mg de proteína; atividade específica = 2,8) foi aplicado à coluna de fosfocelulose (3,0 x 40 cm). A eluição inicial foi levada a efeito com tampão Tris-HCl 50 mM, contendo EDTA 0,001 M e β-mercapto-etanol 0,001 M pH 7,5 a uma velocidade de fluxo de 0,7 ml por minuto. Quando a quantidade de proteína não aldolásica do eluato atingiu a zero, aldolase foi eluída com o mesmo tampão contendo fructose-1,6-difosfato 2,5 mM. Frações de 9 ml foram coletadas sempre na mesma velocidade de fluxo.

Dados relativos ao processo de purificação da aldolase de músculo de coelho são mostrados na Tabela I.

A purificação final atinge 4,3 vezes e 55% de recuperação da atividade enzimática original, o que representa rendimento final de aproximadamente 600 mg de aldolase pura a partir de 132 g de músculo de coelho.

Ao longo do presente trabalho foram utilizadas amostras de enzima cristalina para as experiências das Figuras 7 e 8, enquanto que as demais experiências foram levadas a efeito com enzima contida na fração de maior atividade específica (13-15 unidades internacionais) dos efluentes da coluna de fosfocelulose (Figura 1).

Em uma experiência de eletrofocalização em coluna de Ampholine foi utilizada enzima cristalina para comparar com os resultados obtidos com enzima contida no efluente (Figura 3).

3.2. Homogeneidade das Preparações de Aldolase de Músculo de Coelho

A homogeneidade das preparações de aldolase foi estabelecida por eletroforese de zona em acetato de celulose, por eletroforese em gel de poliacrilamida por cromatografia em fosfocelulose com gradiente de

TABELA I

Purificação de aldolase de músculo de coelho por eluição com substrato

Fração	Volume (ml)	Atividade enzimática total (unidades)	Proteína total (mg)	Atividade específica (Unidades/ mg proteína)	Recuperação (%)	Purificação (x)
Extrato	220	13.260	4730	2,8	100	1,0
Cromatografia em fosfocelulose por eluição com substrato	85	7.393	600	12,3	55	4,3

O músculo estriado de coelho foi extraído com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA e 10^{-3}M de β-mercaptoetanol. Após as etapas de centrifugação como descrito em Material e Métodos. A enzima do extrato bruto foi diretamente purificada por cromatografia em coluna de fosfocelulose por eluição com substrato. A purificação obtida foi de 4,3 vezes com atividade específica de 12,3. Os valores de unidade enzimáticas se referem a unidades internacionais.

KCl. Eletroforese de zona foi levada a efeito em tiras de acetato de celulose usando tampão barbital 0,06 M adicionado de β-mercaptoetanol 0,01 M, pH 8,6, a 250 v, por 90 minutos. A atividade da aldolase foi detectada por meio de coloração obtida a partir da atividade enzimática. Por esse sistema, a atividade da aldolase é acoplada à da triose fosfato desidrogenase, de modo que a clivagem da FDP resulta na formação de NADH que por sua vez causa a redução do nitrotetrazólio azul em sistema com fenazina metossulfato. Paralelamente se procede à coloração de proteína, em tira controle de acetato de celulose, com Azul Brilhante R, Azul coomassie.

Como é mostrado na Figura 2, apenas uma faixa de proteína é obtida a partir do material contido na fração de maior atividade específica dos eluatos da coluna de fosfocelulose.

Nas condições dessa experiência, não há qualquer indicação da presença de isoenzimas de aldolase de músculo de coelho (aldolase A). Mesmo em eletroforese em gel de poliacrilamida, a pH 8,5 a enzima migrou como faixa única de proteína.

A enzima na forma cristalina foi cromatografada em coluna de fosfocelulose com eluição em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo EDTA, 0,001 M e

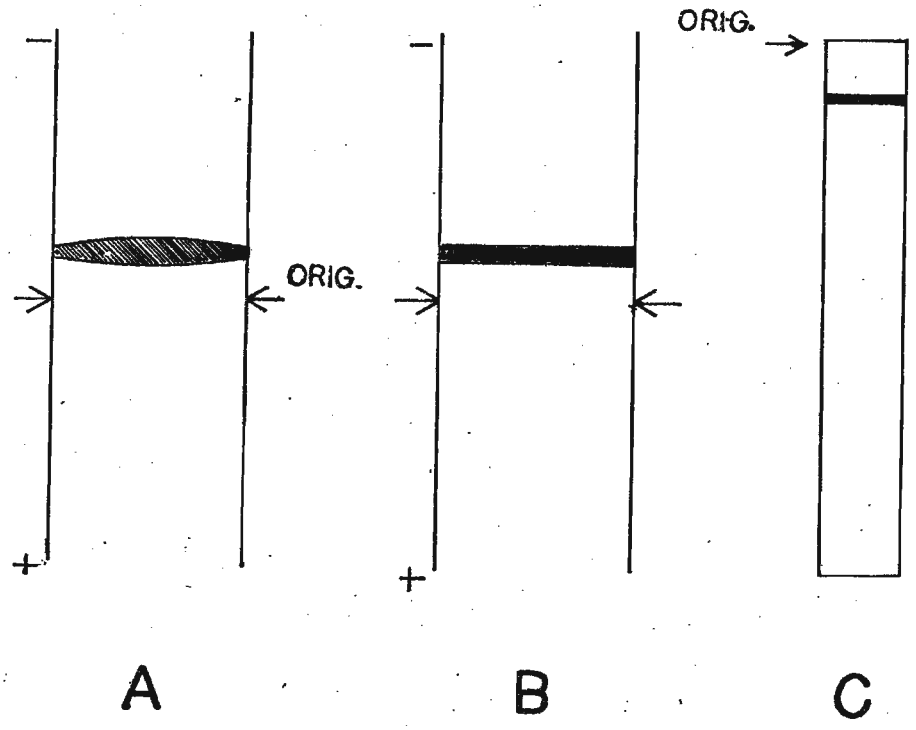

FIGURA 2 - Representação esquemática da resolução por eletroforese em acetato de celulose e em gel de poliacrilamida das preparações de aldolase de músculo de coelho.

FIGURA 2 - Representação esquemática da resolução por eletroforese em acetato de celulose e em gel de poliacrilamida das preparações de aldolase de músculo de coelho. Aldolase purificada em coluna de fosfocelulose foi submetida à eletroforese em acetato de celulose e também à eletroforese em gel de poliacrilamida. A. Determinação da aldolase por coloração obtida em consequência da atividade da enzima. B. Coloração da proteína com Azul Brilhante R. C. Obtenção de disco (único) colorido de proteína em eletroforese de gel de poliacrilamida.

β-mercaptoetanol 10^{-2}M. A esse tampão aplicou-se gradiente linear de KCl entre 0-0,4 M.

Nessas condições obteve-se, também pico simétrico e singular contendo praticamente toda a atividade enzimática da proteína aplicada à coluna.

Assim, em nenhuma das condições acima indicadas, verificou-se heterogeneidade de aldolase A de músculo de coelho.

3.3. Resolução Isoelétrica da Aldolase de Músculo de Coelho

As preparações de aldolase de músculo de coelho consideradas homogêneas nas experiências da Figura 2 foram então estudadas por focalização isoelétrica.

Foi utilizada preparação de aldolase obtida de músculo estriado de coelho adulto (8 meses). Assim, 20 mg de aldolase correspondente à fração de maior atividade específica, obtida por eluição com substrato em coluna de fosfocelulose (Figura 1) foram dialisados contra 8 litros de água desionizada, durante 24 horas. A enzima dialisada foi submetida a focalização isoelétrica usando-se solução de Ampholine a 2%, em gradiente de pH de 7,0-10,0, segundo detalhes mostrados em Material e Métodos.

Sob essas condições, a aldolase foi resolvida em 5 componentes cataliticamente ativos. A Figura 3 mostra a resolução obtida na qual aparecem 4 picos ativos e um componente não bem definido na forma de um pico, mas contendo atividade.

As cinco frações proteicas ativas foram juntadas e novamente submetidas à focalização isoelétrica sem nova adição de Ampholine em faixa mais estreita de pH entre 7,8 e 9,6).

A proteína foi então resolvida em 5 picos nítidos, respectivamente com os pontos isoelétricos de 9,3 ,9,1 , 9,0, 8,8 e 8,4 (Figura 4).

Entretanto, resolução mais completa entre as 5 frações foi praticamente impossível sob as condições usadas no experimento.

Focalização isoelétrica de solução de aldolase cristalina bem como de preparação de músculo de coelho de 2 meses resulta em perfil isoelétrico idêntico ao da Figura 4.

3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Possíveis Híbridos de Aldolase de Músculo de Coelho Separados por Focalização Isoelétrica

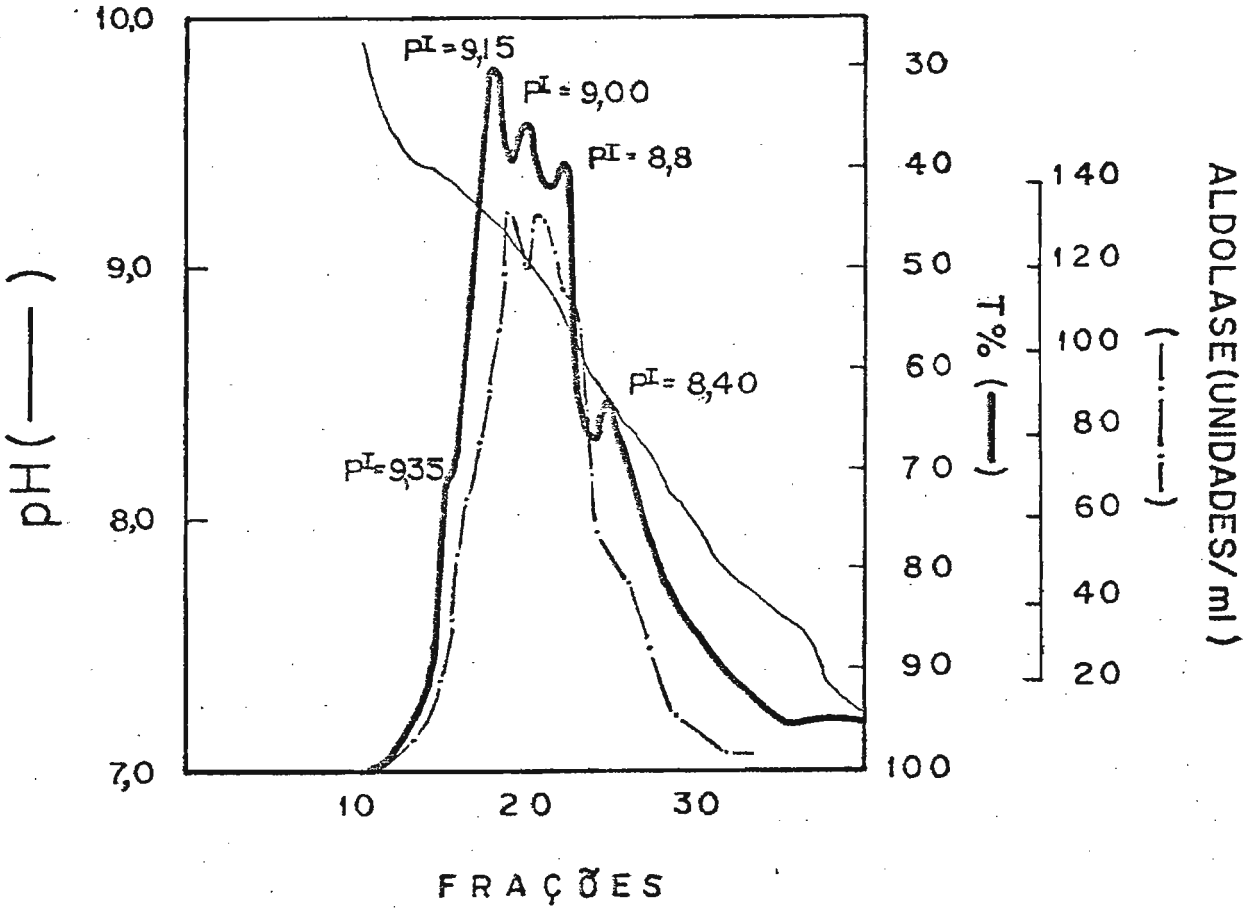

FIGURA 3 - Resolução por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho em pH de 7,0 - 10,0.

FIGURA 3 - Resolução por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho em pH de 7,0 - 10,0. Focalização isoelétrica foi levada a efeito em coluna de Ampholine (pH 7,0 - 10,0) contendo β-mercaptoetanol 10^{-2}M, com gradiente linear de solução de 0 a 47% (w/v) de sacarose. A coluna foi resfriada com circulação de água a 4°C. Foram usados 2 ml de solução contendo 24 mg de proteína previamente dialisada contra 8 litros de água desionizada por 48 horas. A voltagem aplicada foi sendo gradativamente elevada até atingir 800 V a fim de manter o sistema em torno de 203 Watts, por 16 horas. Depois de ser atingido o equilíbrio da corrente elétrica o sistema foi mantido como tal por mais 24 a 36 horas. Quando a corrente se estabilizou em 102 mA esta foi desligada e a coluna foi subsequentemente esvaziada a uma velocidade de fluxo de 1 ml por minuto. Frações de 2 ml foram coletadas e a proteína foi medida usando-se um sistema Uvicord com 0,5 cm de passagem de luz. Concentração hidrogeniônica das diferentes frações foi medida imediatamente após a coleta de cada uma delas em potenciômetro de marca EIL com escala expandida.

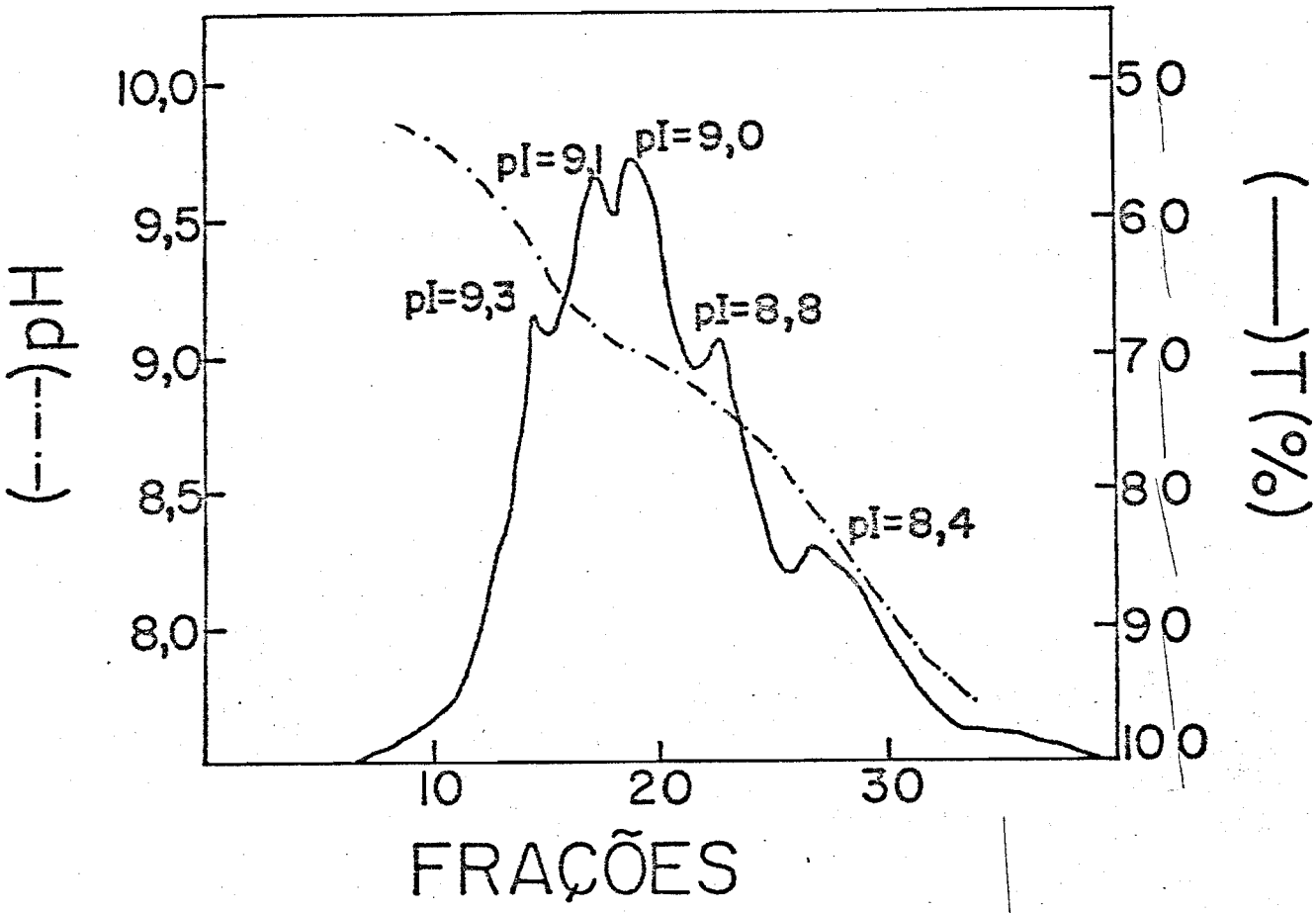

FIGURA 4 - Reisolamento por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho fracionada em faixa mais estreita de pH (7,8 - 9,6).

FIGURA 4 - Reisolamento por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho fracionada em faixa mais estreita de pH (7,8 - 9,6). As cinco frações (pI 9,3 - híbrido α_4 ; pI 9,1 - híbrido $\alpha_3\beta$; pI 9,0 - híbrido $\alpha_2\beta_2$; pI 8,8 - híbrido $\alpha\beta_3$; pI 8,4 - híbrido β_4) de proteínas ativas foram juntadas e novamente submetidas à focalização isoelétrica em faixa mais estreita de pH. Uma quarta parte da fração que continha a proteína e a Ampholine (pH 7,8 - 9,6) foi diluída para 55 ml com água desionizada e utilizada como solução de baixa densidade. As outras três quartas partes foram diluídas com solução de sacarose 55% (w/v) para 55 ml e usada como solução densa. As duas soluções foram adicionadas de β-mercaptoetanol 10^{-2}M. Todo o procedimento de resolução seguiu a mesma metodologia da Figura 3.

A fim de verificar a possível separação de híbridos da aldolase de músculo de coelho por focalização isoelétrica em coluna de Ampholine, uma experiência foi levada a efeito com as proteínas ativas separadas em pI de 9,3 e de 8,4 (Figura 4).

A fração de pI igual a 9,3 corresponde provavelmente ao híbrido α_4 enquanto que de pI 8,4 ao híbrido β_4.

Alíquotas de 1,0 a 5 mg dessas frações e da enzima não resolvida por eletrofocalização foram submetidas a carboximetilação e resolvidas em uréia 8 M e, a seguir, submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia 8 M.

De acordo com a Figura 5, a proteína não resolvida por eletrofocalização apresenta duas bandas correspondente às sub-unidades α e β .

Fração da proteína oriunda do pico no ponto isoelétrico de 9,3, carboximetilada, apresenta banda única correspondente à banda superior (α) da proteína não fracionada. Fração de proteína carboximetilada do pico no ponto isoelétrico de 8,4, apresenta banda densa correspondente à banda inferior (β) da proteína não fracionada.

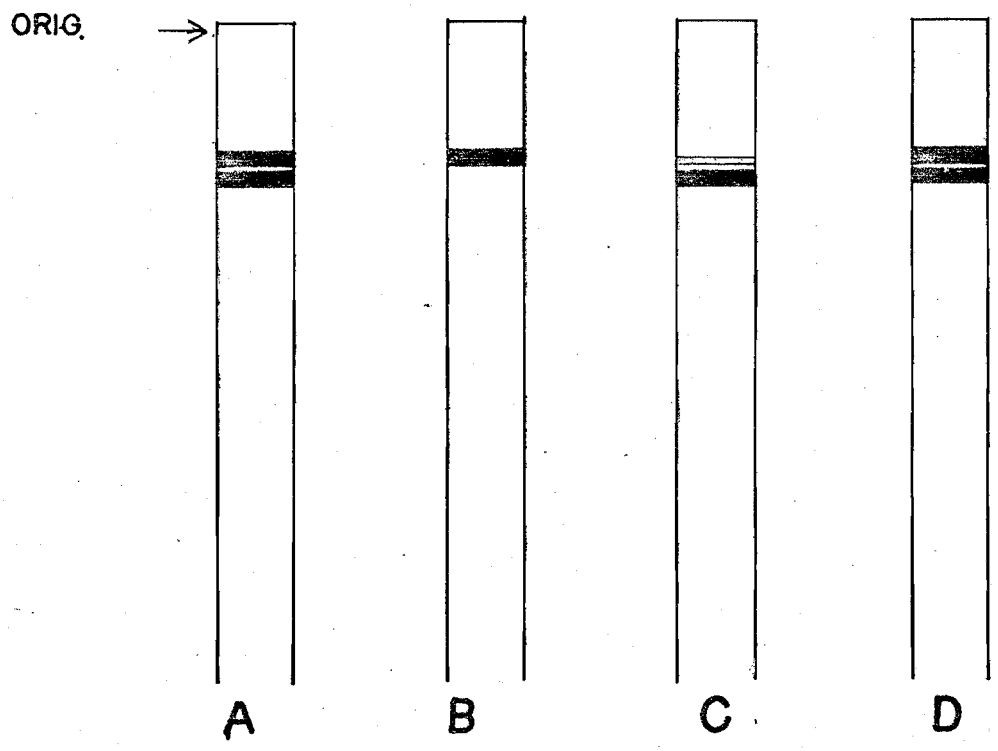

FIGURA 5 - Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida da composição em sub-unidades α e β de proteínas aldolásicas fracionadas nos pontos isoelétricos 9,3 e 8,4

FIGURA 5 - Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida da composição em sub-unidades α e β de proteínas aldolásicas fracionadas nos pontos isoelétricos 9,3 e 8,4. Alíquotas de 1,0 a 5,0 mg das frações obtidas na experiência da Figura 4, bem como alíquotas de proteína aldolásica não fracionada foram carboximetiladas e desnaturadas a seguir por tratamento com uréia 8 M. O material assim tratado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 3,5% de gel e uréia 8 M, aplicando-se corrente de 2 mA por tubo. A proteína migrada foi evidenciada por coloração com Negro de Anilina. A - sub-unidades α e β da enzima não resolvida por eletrofocalização. B - enzima (híbrido α_4) fracionada por focalização isoelétrica a pI 9,3. C - enzima (híbrido β_4) fracionada por focalização isoelétrica a pI 8,4. D - eletroforese da mistura dos híbridos α_4 e β_4. Todos os híbridos utilizados na presente experiência mantinham atividade enzimática.

Eletroforese em gel de poliacrilamida dos dois picos carboximetilados, respectivamente, nos pontos isoelétricos 9,30 e 8,4, resultou em duas bandas correspondentes à proteína não fracionada.

3.5. Resolução por Focalização Isoelétrica de Aldolase de Músculo de Coelho sob Condições de Dissociação

As condições de focalização isoelétrica de aldolase de músculo de coelho sob condição dissociada foram as mesmas descritas em Material e Métodos exceto que a solução de eletródio e o gradiente de sacarose continham uréia 6 M e a temperatura foi de 10°C. Foi usada Ampholine na concentração final de 1% (pH 7,0 - 10,0).

A presente experiência foi levada a efeito com aldolase de músculo de coelho adulto não cristalizada e obtida por eluição com substrato a partir de coluna de fosfocelulose.

Como é mostrado na Figura 6 a aldolase de músculo de coelho adulto se resolve em dois componentes revelados por duas amplas faixas de absorção, respectivamente a pI 8,99 (sub-unidade α) e pI 8,61 (sub-unidade β). Aparecem ainda no perfil de fracionamento por focalização isoelétrica dois componentes menores a pI 8,1 e 7,33 de significado desconhecido.

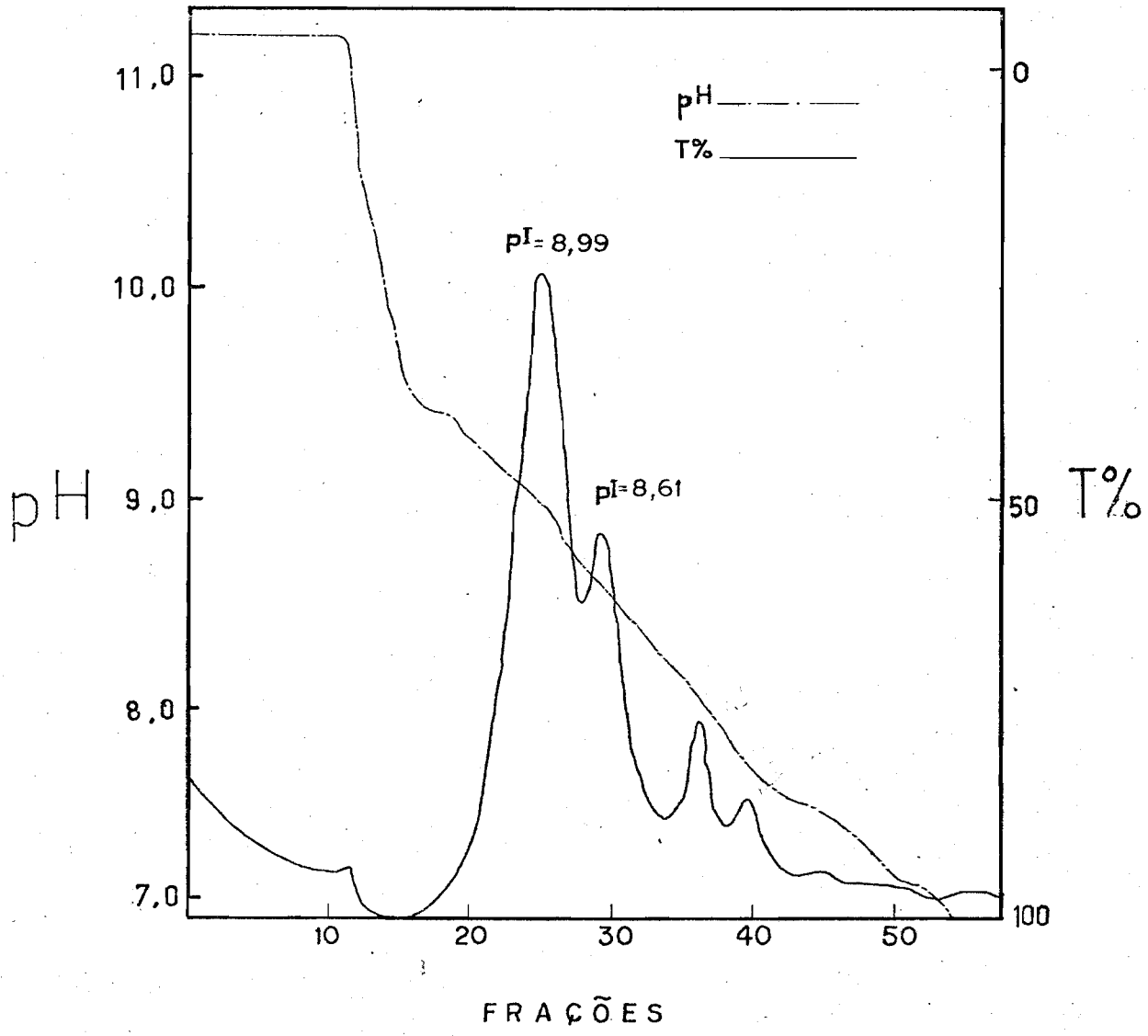

FIGURA 6 - Resolução por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho em condições experimentais de dissociação.

FIGURA 6 - Resolução por focalização isoelétrica da aldolase de músculo de coelho em condições experimentais de dissociação. Solução de 2 ml de enzima (16,8 mg de proteína) obtida por eluição com substrato da coluna de fosfocelulose foi adicionada de uréia até a concentração final de 6 M. Esse material foi submetido a fracionamento por eletrofocalização em coluna, levada a efeito à temperatura de 10°C e mantida a não mais do que 2,0 watts submetendo-se a coluna a potencial de eletródio de 450 V por 24 horas, aumentando-a gradativamente até 700 V. Sob essas condições, 48 horas foram necessárias para a corrente atingir 1 a 2 mA. O tempo de focalização foi estendido por mais 24 horas como foi sugerido por VESTERBERG e SVENSSON (95). Assim, o total do tempo de focalização variou de 72 a 96 horas. Após o término do período de fracionamento, a coluna foi esvaziada da maneira usual e frações de 2 ml foram coletadas. A concentração hidrogeniônica foi medida em potenciômetro EIL, com escala expandida, imediatamente após a coleta. Proteína foi medida em UVcord.

Quando as frações maiores foram examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia 8 M, sem carboximetilação, pela técnica de CHAN et al. (79), ambas as frações foram resolvidas em duas faixas singulares com migração diferentes.

É bem possível que os picos de menor expressão representem material heterogêneo sem maior significado, e resultem da ação prolongada da uréia sobre a proteína.

3.6. A Presença de Sub-Unidades de Aldolase de Músculo de Coelho em Diferentes Idades

A fim de verificar a natureza das sub-unidades α e β de aldolase de músculo de coelhos de 1 dia até 8 meses foram utilizados. Aldolase desses animais foi cristalizada segundo técnica descrita em Material e Métodos.. Alíquotas carboximetiladas (10,0 a 20,0 g) de aldolases de coelhos de 1, 10, 25, 60 e 240 dias foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. (Figura 7).

A figura 7 revela que aldolase de coelho de 1 dia contém apenas híbridos de tipo α_4 . Este último fato foi comprovado pela experiência da Figura 8 onde se fez eletroforese em gel de poliacrilamida da aldolase cris

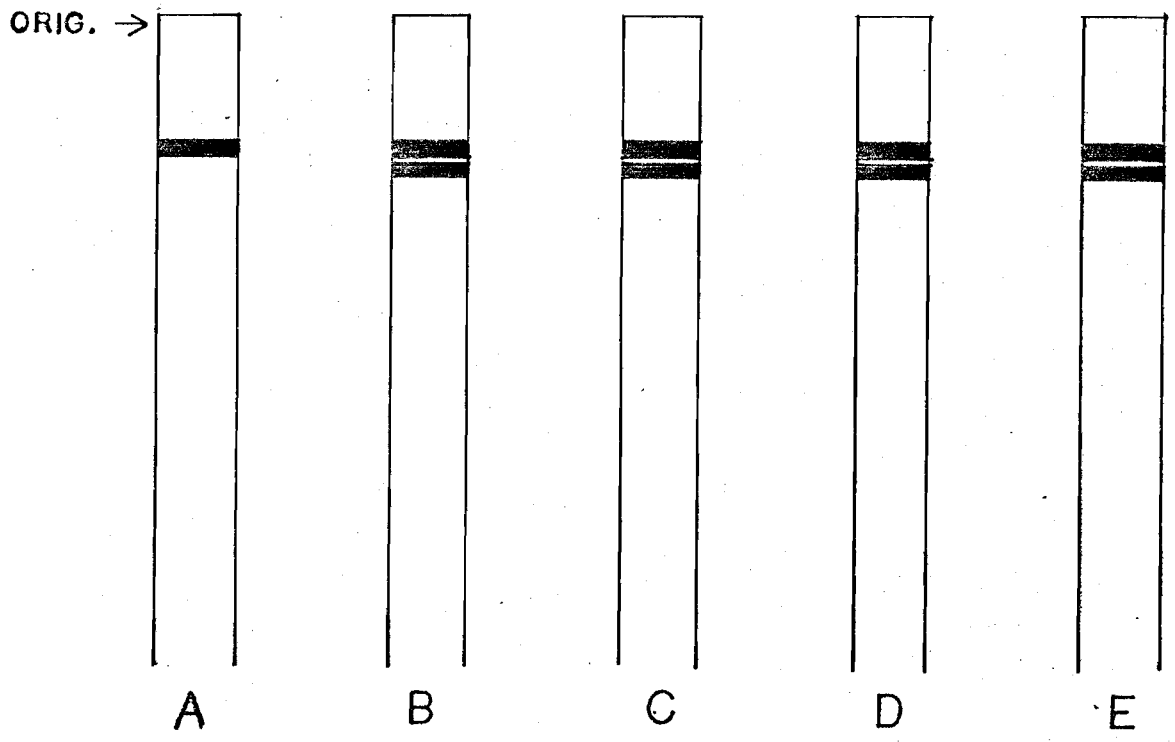

FIGURA 7 - A presença de sub-unidades α e β de aldolase de músculo de coelho em relação à idade dos animais.

FIGURA 7 - A presença de sub-unidades α e β de aldolase de músculo de coelho em relação à idade dos animais. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia 8 M foi levada a efeito com enzima cristalina, carboximetilada, preparada a partir de animais de diferentes idades. A- aldolase de músculo de coelho de 1 dia de idade contendo híbrido α_4, apenas. B, C, D e E - aldolases de músculo de coelho de 10, 25, 60 e 240 dias de idade, respectivamente, contendo α e β sub-unidades.

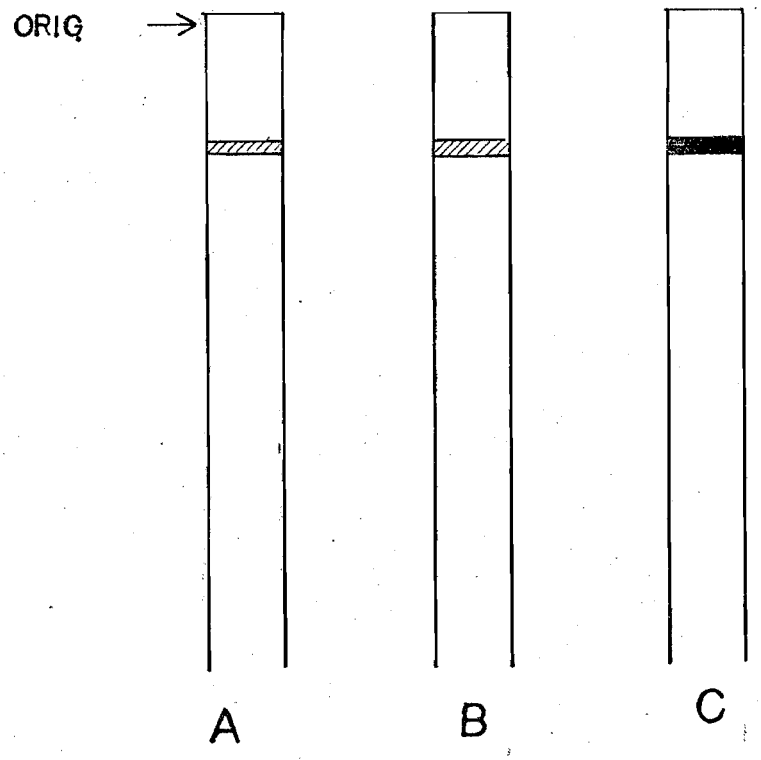

FIGURA 8 - Híbrido α_4 da aldolase de músculo de coelho de 1 dia.

FIGURA 8 - Híbrido α_4 da aldolase de músculo de coelho de 1 dia. Alíquota de aldolase cristalina de coelho de 1 dia foi carboximetilada e levada a migrar em eletroforese de gel de poliacrilamida em uréia 8 M. Paralelamente, híbrido α_4 obtido por fracionamento por focalização isoelétrica foi também carboximetilado e levado a migrar em campo eletroforético nas mesmas condições, bem como amostra contendo mistura de aldolase de músculo de coelho de 1 dia e do híbrido α_4 . A - migração de aldolase de músculo de coelho de 1 dia. B - migração do híbrido α_4 ; C - migração em faixa única da mistura das amostras A e B.

talina de coelho de 1 dia, bem como da fração de pI 9,3 (Figura 4) constituída de híbrido α_4. Nesta última experiência verificou-se que aldolase de coelho de 1 dia contém exclusivamente aldolase do tipo α_4, já que esta migrou no campo eletroforético como faixa única, tal como o híbrido α_4 da fração de pI 9,3. A mistura de ambas resultou em faixa única de proteína migrada.

Por outro lado, já o animal de 10 dias de idade mostra resolução da aldolase em 2 faixas coloridas, o que indica que a formação de sub-unidades β ocorre entre o primeiro e décimo dias de crescimento do animal. A partir de 10 dias, como é de se esperar, todas as amostras estudadas eram compostas de α e β sub-unidades.

4. DISCUSSÃO

4.1. Purificação

Muitas enzimas altamente purificadas mostram homogeneidade pela aplicação de vários critérios, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida, ultracentrifugação e propriedades imunológicas, bem como por cristalização.

Na realidade, quando proteínas dessa natureza são submetidas a determinados processos de fracionamento, é possível demonstrar a existência de microetero geneidade molecular. Preparações altamente purificadas e homogêneas de gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase e de piruvatoquinase de músculo de coelho, de desidrogenase láctica de músculo de coelho e enolase de levedura exibem clara heterogeneidade molecular.

O grau de heterogeneidade de uma população de enzimas é de considerável interesse do ponto de vista químico, fisiológico e genético, bem como para estudos de estrutura enzimática. Por exemplo, estudos de propriedades catalíticas de estrutura de enzimas exibem população homogênea de moléculas.

Entretanto, se uma enzima contém mais do que uma sub-unidade não idêntica, a possibilidade de formação ou a presença de híbridos é consideravelmente grande. Acredita-se que os híbridos ou as formas múltiplas de enzimas ocorrem intracelularmente, originadas a partir de genes não alélicos separados ou simplesmente como produtos alelomórficos distintos, derivados de um heterozigoto.

Por outro lado, formas múltiplas podem ser o resultado de modificações de proteínas, tais como troca de sub-unidades durante os processos de isolamento e de purificação.

Também heterogeneidade pode ser o resultado da degradação de proteínas durante os processos de purificação e durante experimentos que necessitam expor a proteína a ácidos ou bases ou mesmo uréia.

Aldolase de músculo de coelho mostra-se homogênea por todos os critérios de purificação, mas ela se mostra certamente heterogênea quando submetida à focalização isoelétrica resolvendo-se em 5 formas múltiplas que podem ser separadas nos seus respectivos pontos elétricos.

A presença dessas formas múltiplas origina numerosas questões, tais como se essas formas híbridas

ocorrem intracelularmente ou se elas são o resultado de modificações da molécula da enzima durante o seu isolamento por troca de sub-unidades entre as sub-unidades e de moléculas distintas.

A fim de conseguir obter aldolase de músculo de coelho nas fórmas moleculares em que elas se encontram nas células, enzima foi purificada por meio de método simples de modo a não submetê-la à ação de agentes mais agressivos. Nessas condições, é possível obter a proteína com mínimo de heterogeneidade. No presente trabalho, foi aplicado método de purificação rápido e simples.

O músculo foi extraído a pH 7,5 com tampão Tris-HCl, portanto em condição muito mais suave do que a do método clássico de TAYLOR et al. (10), que usaram solução de hidróxico de potássio 0,003 M, que pode ocasionar dissociação parcial das sub-unidades proteicas.

O extrato obtido em tampão Tris-HCl, logo após a centrifugação, é diretamente aplicado a uma coluna de fosfocelulose, ao mesmo pH, e utilizando o mesmo tampão, para eliminar a possibilidade da enzima permanecer dissolvida no extrato cru por longo período de tempo, e dessa forma minimizando a possibilidade de ação de exopeptidases. Várias observações sugerem que um certo

grau de degradação ou de modificações da enzima pode ocorrer nos extratos crus (49). Eluição com fructose-difosfato 2,5 mM foi também levada a efeito.

Para a detecção de formas híbridas, sempre foi utilizada a amostra oriunda da fração de efluente com maior atividade específica.

A razão para a eliminação da etapa de cristalização em muitas das experiências mostradas neste trabalho é de que nenhum estudo foi ainda conduzido sobre o efeito que o sulfato de amônio pode exercer sobre a estabilidade da estrutura quaternária de aldolase de músculo de coelho.

De fato, como está mostrado nos Resultados, as 5 formas híbridas (α_4, $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$, β_4) podem ser detectadas quando a amostra é cristalizada ou não, mas este ponto deve ser estudado com muito mais detalhes desde que se possa separar os híbridos α_4 e β_4.

O ponto negativo do processo de purificação mostrado aqui é o uso de fructose-difosfato em concentração de 2,5 mM, já que se sabe que a fructose-difosfato possui efeito inibitório sobre aldolase como foi observado por WOODFIN (89) e LAI et al. (97), mas na presente experiência o tempo em que a enzima foi exposta à fructose-difosfato foi mínimo em comparação com o que

ocorre com experiências onde se estuda a ação de FDP sobre a estabilidade da proteína enzimática.

A enzima sem cristalização mostrou-se pura, usando-se eletroforese de gel de poliacrilamida e ultracentrifugação, bem como tendo a mesma atividade específica do que a da enzima na forma cristalina.

4.2. Estudos de Sub-Unidades de Aldolase de Musde Coelho

Aldolase de músculo de coelho (Aldolase A) migra em tiras de acetato de celulose como faixa única, que pode ser detectada por técnicas de coloração baseadas na atividade da enzima ou por coloração da proteína. Aldolase C (49) também migra nas mesmas condições, isto é, formando faixas singulares mas difere na mobilidade da aldolase A.

Quando a aldolase A é dissociada a concentrações hidrogêniônicas altas e novamente reassociada, uma faixa singular de proteína pode também ser detectada pela técnica de coloração desenvolvida na base da atividade da enzima. Esse fato ocorre também com aldolase C.

Quando aldolases A e C colocadas num mesmo sistema são dissociadas em suas sub-unidades e reasso

ciadas novamente, um conjunto de cinco híbridos pode ser detectado usando-se a técnica de coloração pela atividade enzimática. A partir desse trabalho levados a efeito por RUTTER e seus colaboradores (76), concluiu-se que as aldolases A e C são constituídas de 4 sub-unidades com base em sub-unidades idênticas existentes em ambas aldolases A e C. Por outro lado, CHAN et al. (79) apresentaram dados experimentais sobre a existência de sub-unidades não idênticas da aldolase de músculo de coelho. Esse fato origina numerosas questões, a propósito dos estudos de hibridização levados a efeito por RUTTER e seu grupo (76), já que o número de híbridos detectados (ao todo 5), foi difícil de ser explicado na presença de 4 sub-unidades não idênticas.

Como foi mostrado na experiência da Figura 2, aldolase migra como faixa única usando eletroforese em acetato de celulose ou em gel de poliacrilamida. Entretanto, quando a mesma amostra que foi usada nas tiras de acetato de celulose foi submetida à focalização isoelétrica, cinco picos, todos eles possuindo atividade, foram detectados. A técnica de focalização isoelétrica envolve separação de proteínas de diferentes pontos isoelétricos por eletroforese em um gradiente de pH. Possuindo extraordinária capacidade de resolução, essa técnica mostrou que aldolase de músculo de coelho é constituída por 5 componentes cataliticamente ativos.

Não há qualquer dúvida, aparentemente, que os 5 únicos híbridos formados entre aldolases A e C se devem à formação de híbridos tendo mobilidade eletroforética similar e que não podem ser detectados por eletroforese em acetato de celulose.

Por outro lado, aldolase A mostra um conjunto de 5 híbridos, separados respectivamente aos pontos isoelétricos 9,3, 9,1, 9,0, 8,8 e 8,4. Sob condição não dissociativa, quando a proteína é carboximetilada e submetida à eletroforese de gel de poliacrilamida em uréia 8 M, obtém-se migração de duas faixas que correspondem às sub-unidades α e β. Por sua vez, quando alíquotas da fração obtida a pI = 9,3 por focalização isoelétrica ou a pI = 8,4, são submetidas a mesmo processo, obtém-se de cada uma delas apenas uma faixa de proteína que migra, sendo a da primeira correspondente ao híbrido α_4 e o da segunda ao híbrido β_4. Quando, porém, alíquotas das frações de pI = 9,1, 9,0 e 8,8 são utilizadas nesse tipo de experimento, a eletroforese de gel de poliacrilamida em uréia 8 M resolve-as em duas faixas de proteínas que migram e que correspondem às sub-unidades α e β (Figura 5). Na experiência da Figura 5 a fração correspondente a β_4 sempre apareceu contaminada com traços da sub-unidade α.

Desse modo, estabelece-se claramente que o pico a pI 9,3 (Figura 4) é composto unicamente de sub-unidades α e que o pico a pI 8,4 de sub-unidades β, de modo que a estrutura do primeiro é α_4 e a do segundo β_4. Por outro lado, a estrutura das outras formas de aldolase fracionadas a pI 9,1, 9,0 e 8,8 é respectivamente $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$.

A estrutura $\alpha_2\beta_2$ para aldolase de músculo de coelho foi proposta por CHEN et al. (79), mas como é mostrado no trabalho presente, a enzima é composta de 5 híbridos formados por combinação ao acaso entre duas sub unidades muito próximas mas distintas entre si, para formar tetrâmeros de aldolase.

A possibilidade de que possam ter ocorrido trocas de sub-unidades durante o método de purificação empregado no presente trabalho a partir do híbrido $\alpha_2\beta_2$ para dar os cinco híbridos encontrados pode ser eliminada com base nos seguintes argumentos.

a) O método de purificação empregado foi de modo a proporcionar a mínima probabilidade possível de produzir heterogeneidade;

b) A estrutura quaternária da aldolase de músculo de coelho é bastante estável a pH 7,5, utilizado durante todo o processo de purificação.

c) Troca de sub-unidades pode ocorrer apenas a concentrações hidrogeniônicas muito altas ou muito baixas (96);

d) A enzima foi purificada sem qualquer adi - ção de sulfato de amônio, o qual pode, aparentemente, conduzir a troca de sub-unidades. No presente trabalho, sulfato de amônio foi empregado, apenas, durante a etapa de cristalização da enzima mas não para o seu fracionamento como é usual no método de TAYLOR et al. (10).

e) Dessa forma, os híbridos encontrados devem ter sido originados intracelularmente e não como conse - quência do processo de purificação da enzima.

4.3. A Presença de Sub-Unidades α e β

O aparecimento de sub-unidades α e β de aldolase de músculo de coelho em animais de diferentes idades foi estudado no presente trabalho (Figura 7).

A enzima foi cristalizada a partir de ani - mais de 1, 10, 25, 60 e 240 dias e as diferentes amostras foram carboximetiladas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em uréia 8 M, portanto, em condição de dissociação.

Aldolase obtida a partir de coelho de 1 dia resulta em faixa única de proteína. Como é mostrado na

Figura 8, quando aldolase carboximetilada obtida de coelho de 1 dia foi adicionada à híbrido α_4, ambas as proteínas migraram como faixa única. Dessa forma, é certamente claro que aldolase de coelho de 1 dia contém somente a forma α_4. Por sua vez, a aldolase de coelho de 10 dias já revela a presença de ambas α e β sub-unidades, o que significa que as formas híbridas que as contêm podem já ser detectadas a partir do décimo dia de vida dos animais. O aparecimento de sub-unidade β entre as idades de 1 dia a 10 dias não foi estudado no presente trabalho. mas foi sugerido por LAI et al. (84) que as sub-unidades β se originam por modificação das sub-unidades α .

Por outro lado, KOIDA et al. (85) sugerem que sub-unidades aparecem quando os coelhos atingem 3 meses de idade aumentando de frequência ao longo do crescimento do animal para atingir valores máximos na idade adulta, na qual quantidades aproximadamente iguais de ambos tipos de sub-unidades estão presentes. Nos esperimentos de KOIDA et al. (85) apenas traços de sub-unidade aparecem em coelhos jovens (com menos de 3 meses), as suas experiências tendo sido levadas a efeito com animais a partir de 1 mes de idade.

Entretanto, como é mostrado na Figura 7, sub unidades β aparecem em quantidade que se assemelha muito

à da α, já em coelhos de 10 dias e, ainda, focalização isoelétrica de aldolase de coelho de 2 meses mostrou perfil de fracionamento semelhante ao da aldolase de coelho de 8 meses.

KOIDA et al. (85) analisando as sub-unidades α e β concluiram que as diferenças moleculares entre ambas eram confinadas à região próxima da extremidade carboxiterminal o que foi confirmado pelo achado da substituição de um resíduo de asparagina de sub-unidade α por ácido aspártico na sub-unidade β (84). É importante assinalar que até o presente momento, a análise sequencial não permitiu revelar qualquer outra diferença entre ambos tipos de sub-unidades (44).

Desse modo, é possível admitir-se que a diferença encontrada na extremidade COOH- terminal das cadeias α e β de aldolase seja a responsável única explicação plausível para a microeterogeneidade mostrada pela aldolase de músculo de coelho.

Entretanto, no estado atual dos experimentos mostrados no presente trabalho, não se pode explicar de modo conclusivo a razão pela qual ocorrem as discrepâncias entre a idade dos animais aqui estudados e os estudados por KOIDA et al. (85) no que diz respeito ao aparecimento das sub-unidades do tipo β. É provável que

tal fato ocorre em razão de diferenças nas raças dos coelhos utilizados ou por outros fatores não identificados até agora.

Afastadas essas possibilidades, porém, é viável admitir-se que outros pontos da molécula proteica, além daqueles próximos da extremidade COOH-terminal possam estar envolvidos na transformação das sub-unidades α em sub-unidades β.

5. CONCLUSÕES

5.1. Preparações altamente purificadas de aldolase de músculo de coelho revelam aparente homogeneidade quando analisadas por critérios de pureza tais como eletroforese em gel de poliacrilamida e em acetato de celulose e por ultracentrifugação.

5.2. Múltiplas formas de aldolase de músculo de coelho são obtidas a diferentes valores de pI quando a proteína é fracionada pela técnica de focalização isoelétrica, separando as proteínas.

5.3. Nas condições de preparação utilizada, há grande probabilidade de que as formas múltiplas de aldolase encontradas ocorram já preformadas na célula e não resultem de modificações ocorridas como consequência das operações de purificação.

5.4. A eletroforese das formas α_4 e β_4 carboximetiladas, em gel de poliacrilamida e em estado de dissociação, revela faixa única de proteína em cada um dos casos considerados.

5.5. As sub-unidades α e β da aldolase de músculo de coelho podem ser separadas por eletrofocalização com gradiente de Ampholine na presença de uréia 6 M.

5.6. Em coelhos de um dia ocorre o aparecimento único da forma α_4 de aldolase que no decorrer de 10 dias do crescimento do animal já dá origem às sub-unidades β.

SUMÁRIO

Foi levado a efeito estudo sobre formas múltiplas de aldolase de músculo de coelho. A enzima foi purificada a pH 7,5 por eluição com substrato a partir de coluna de fosfocelulose. A enzima foi ainda cristalizada por diálise dessas preparações contra solução saturada de sulfato de amônio. Formas múltiplas de aldolase foram obtidas por fracionamento a diferentes pI por eletrofocalização em gradiente de Ampholine na faixa de pH entre 7,0 a 10,0. Nessas condições foram separados cinco híbridos resultantes da associação ao acaso das sub-unidades α e β, os quais foram analisados em estado de dissociação a partir de proteínas carboximetiladas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uréia 8M. Foi também estudado o aparecimento de sub-unidade α e β em músculo de coelhos de idades que variavam de 1 a 240 dias, verificando-se que em coelhos de 1 dia existia apenas a proteína α_4, surgindo sub-unidades β já em animais de 10 dias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLETCHER, W.M. & HOPKINS, F.G. - Lactic acid in amphibian muscle. J. Physiol., London, 35:247-309, 1907.

2. MEYERHOF, O. - The isolation glucolytic enzyme from the muscle and the mechanism of lactic acid formation in solution. Naturwiss., Berlin, 14:1175-80, 1926.

3. EMBDEN, G.; DEUTICKE, H.J. & KRAFT, G. - Ueber die intermediären Vorgänge bei der Glycilyse in der Muskulatur. Klin. Wochsder., Berlin, 12:213-5, 1933.

4. MEYERHOF, O. & LOHMANN, K. - Ueber die enzymatische Gleichgewits Reaktion zwischen HexoseDiPhosphorsäure and Dioxyaceton Phosphorsäure. Biochem. Z., Berlin, 271:89-110, 1934.

5. MEYERHOF, O.; LOHMANN, K. & SCHUSTER, P. - Aldolase a carbonbinding enzyme. I. Aldol condensation of dihtdroxyacetone phosphate and acetaldehyde. Biochem. Z., Berlin, 286:301-18, 1936.

6. MEYERHOF, O.; LOHMANN, K. & SCHUSTER, P. - Aldolase a carbonbinding enzyme. II. Aldol condensation of dihydroxyacetone with glyceraldehyde. Biochem. Z., Berlin, 286:319-35, 1936.

7. MEYERHOF, O. - Sur l'isolement de l'acide 3-glyceraldehyde phosphorique biologique au cours de la dégradation enzymatique de l'acide hexose diphosphorique (1er. mémoire). Bull.Soc.Chim.Biol., Paris, 20:1033-42, 1938.

8. MEYERHOF, O. - Sur l'isolement de l'acide 3-glyceraldehyde phosphorique biologique au cours de la dégradation enzymatique de l'acide hexose diphosphorique (2ème. mémoire). Bull. Soc.Chim. Biol., Paris, 20:1345-58, 1938.

9. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. - Isolierung und Kristallization des Garungsferments Zymohexase. Biochem.Z., Berlin, 314:149-76, 1943.

10. TAYLOR, J.F.; GREEN, A.A. & CORI, G.T. - Crystalline aldolase. J. biol.Chem., Baltimore, 173:591-604, 1948.

11. RUTTER, W.J. - Aldolase. IN: Boyer, P.D ; Lardy, H. & Myrbäck, K. - The enzymes. Second edition. New York, Academic Press, 1961, v. 5, p. 341-66.

12. GROVES, W.E. & RUTTER, W.J. - Conservation of molecular properties of aldolases in phylogeny. Fed.Proc., Washington, 21:254, 1962.

13. JAGANNATHAN, V.; SINGH, K. & DAMODARAN, M. - Carbohydrate metabolism in citric acid fermentation. IV. Purification and properties of aldolase from Aspergillus niger. Biochem. J., London, 63:94-105, 1956.

14. RUTTER, W.J. & LING, K.H. - The mechanism of action of fructose diphosphate aldolase. Biochim.Biophys. Acta , Amsterdam, 30:71-9, 1958.

15. RICHARDS, O.C. & RUTTER, W.J. - Preparation and properties of yeast aldolase. J.biol.Chem., Baltimore, 236:3177-84, 1961.

16. WESTHEAD, E.W.; BUTLER, L. & BOYER, P.D. - (Binding sites, reactivation phenomena, and possivle dissulfide groups of rabbit muscle aldolase. Biochem., New York, 2(5):927-34 1963.

17. GARY, N.D.; KUPFERBERG, L.L. & GRAF, L.H. - Demonstration of an iron-activated aldolase in sonic extracts of Brucella suis. J.Bacteriol., Baltimore, 69:478-9, 1955.

18. KNOX, W.E.; STUMPF, P.K.; GREEN, D.E. & AUERBACH, V.H.- The inhibition of sulphydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. J.Bacteriol., Baltimore, 55:451-8, 1948.

19. KUHN, R. & TIEDEMANN, H. - Metabolism of Lactobacillus bifidus; conversion of 1-C^{14}-glucose. Z.Naturforsch., Wiesbaden, 8b:428-36, 1953.

20. SU, T.C. & LING, K.H. - Aldolase from BCG. J.Formosa Med.Assoc., 55:216-20, 1956. Apud: Advanc.Enzymol. New York, 31:125-81, 1968.

21. BARD, R.C. & GUNSALUS, I.C. - Glucose metabolism of Clostridium perfringens: existence of metallo-aldolase. J.Bacteriol., Baltimore, 59:387-400, 1950.

22. RUTTER, W.J. - Evolution of aldolase. Fed.Proc., Washington, 23:1248-57, 1964.

23. RICHARDS, O.C. & RUTTER, W.J. - Comparative properties of yeast and muscle aldolase. J.Biol.Chem., Baltimore, 236:3185-92, 1961.

24. WARBURG, O. & GAWEHN, K. - Isolation of yeast zymohexase and its crystallization as a mercury salt. Z.Naturforsch., Wiesbaden, 9b:206-8, 1954.

25. KOWAL, J.; CREMONA, T. & HORECKER, B.L. - Fructose-1,6-diphosphate aldolase in Candida utilis. Purification and properties. Arch.Biochem.Biophys., New York, 114(1):13-23, 1966.

26. GROVES, W.E. - Tese |University of Illinois, E.U.A., 1962| Apud: MORSE, D.E. & HORECKER, B.L. - The mechanism of action of aldolases. Advanc.Enzymol., New York, 31:125-81, 1968.

27. RUTTER, W.J. - IN: BRYSN, V. & VOGEL, H.J., eds. Evolving genes and proteins. New York, Academic Press, 1965. p. 279.

28. BLOSTEIN, R. & RUTTER, W.J. - Comparative studies of liver and muscle aldolase. II. Immunochemical and chromatographic differentiation. J.biol.Chem., Baltimore, 238:(10):3280-5, 1963.

29. SUSOR, W.A.; KOCHMAN, M. & RUTTER, W.J. - Heterogeneity of presumably homogeneous protein preparations. Science, Washington, 165(3899):1260-2, 1969.

30. RUTTER, W.J. & GROVES, W.E. - IN: LEONE, C.A., ed. Taxanomic biochemistry, physiology and serology. New York, Ronald Press, 1964.

31. GRACY, R.W.; LACKO, A.G.; BROX, L.W.; ADELMAN, R.C. & HORECKER, B.L. - Structural reactions in aldolases purified from rat liver and muscle and Novikoff hepatoma. Arch.Biochem.Biophys., New York, 136:480-90, 1970.

32. CHRISTEN, P.; RENSING, U.; SCHMID, A. & LEYTHARDT, F. - Multiple forms of aldolase in organ extracts of rats. Helv.Chim.Acta, Basel, 49(6):1872-5, 1966.

33. RENSING, U.; SCHMID, A.; CHRISTEN, P. & LEUTHARDT, F. - Aldolases. XIII. Purification and some properties of aldolase isoenzymes from bovine brain and muscle. Hoppe,Seyler's Z. physiol. Chem., Berlin, 348(8):1001-4, 1967.

34. LEBHERZ, H.G. & RUTTER, W.J. - Distribution of fructose-diphosphate aldolase variants in biological systems. Biochem., New York, 8(1):109-21, 1969.

35. NICHOLAS, P.C. & BACHELARD, H.S. - The separa'ion, partial purification and some properties of isoenzymes of aldolase from Guinea-pig cerebral cortex. Biochem J., London, 112:587-94, 1969.

36. BROX, L.W.; LACKO, A.G.; GRACY, R.W.; ADELMAN, R.C. & HORECKER, B.L. - Muscle type aldolase isolated from a liver tumour. Biochem.Biophys.Res.Commun., New York, 36(6):994-8, 1969.

37. MARQUARDT, R.R. - Multiple molecular forms of avian aldolases. I. Crystallization and physical properties of chicken (Gallus domesticus) breast muscle aldolase. Can.J.Biochem., Ottawa, 47: 517-26, 1969.

38. MARQUARDT, R.R. - Multiple molecular forms of avian aldolases. IV. Purification and properties of chicken (Gallus domesticus)brain aldolases. Can.J.Biochem., Ottawa, 48:322-3, 1970.

39. MARQUARDT, R.R. - Multiple molecular forms of avian aldolases. II. Enzymic properties and amino acid composition of chicken (Gallus domesticus)breast muscle aldolase. Can.J.Biochem., Ottawa, 47: 527-34, 1969.

40. OCAMPOS, D. - Aspectos cinéticos e estruturais da aldolase da fructose-1,6-difosfato (D-fructose-1,6-difosfato: D-gliceraldeido-3-fosfato-ligase) de músculo cardíaco de bovino (E.C.4.1.2.13). São Paulo, 1972. 67 p. |Tese - Instituto de Qúímica da USP|.

41. DORRY, H.F.A. - Purificação, cristalização e propriedades da aldolase da fructose-1,6-difosfato de coração de coelho. São Paulo, 1971. 71 p. |Tese - Faculdade de Medicina Veterinária da USP|.

42. LAI, C.Y. & CHEN, C. - Codfish muscle aldolase. Purification, properties and primary structure around the substrate binding-site. Arch.Biochem. Biophys., New York, 144(2):467-75, 1971.

43. TING, S.M.; SIA, C.L.; LAI, C.Y. & HORECKER, B.L. - Frog muscle aldolase. Purification of the enzyme and structure of the active site. Arch.Biochem. Biophys., New York, 144(2):485-90, 1971.

44. LAI, C.Y. - Studies on the structure of rabbit muscle aldolase. I. Cleavage with cyanogen bromide: an approach to the determination of the total primary structure. Arch. Biochem.Biophys., New York, 128:202-11, 1968.

45. GUHA, A.; LAI, C.Y. and HORECKER, B.L. - Lobster muscle aldolase. Isolation, properties, and primary structure at the substrate-binding site. Arch.Biochem.Biophys., 147(2):692-706,1971.

46. ANDERSON, P.J.; GIBBONS, I. & PERHAM, R.N. - A comparative study of the structure of muscle fructose-1,6-diphosphate aldolases. Europ.J.Biochem., Berlin-West, 11:503-9, 1969.

47. CRIVELLARO, O. - Estudo comparativo entre aldolase da fructose-1,6-difosfato: D-gliceraldeído-3-fosfato-ligase (E.C. 4.1.2.13) de músculo peitoral de Gallus domesticus e de Columbia livia. 94 p. São Paulo, 1972 |Tese apresentada ao Instituto de Química da USP|:

48. GRACY, R.W.; LACKO, A.G. & HORECKER, B.L. - Subunit structure and chemical properties of rabbit liver aldolase. J.biol.Chem., Baltimore, 244(14):3913-9, 1969.

49. PENHOET, E.E.; KOCHMAN, M. & RUTTER, W.J. - Molecular and catalytic properties of aldolase C. Biochem., New York, 8(11):4396-402, 1969.

50. BRENNER-HOLZACH, O. & LEUTHARDT, F. - Aldolases.XIV. Purification and crystallization of aldolase from Drosophila melanogaster. Helv.Chim.Acta, Basel, 51(5):1131-4, 1968.

51. BRENNER-HOLZACH, O. & LEUTHARDT, F. - Aldolases.XII. Aldolases from Drosophila melanogaster. Helv. Chim.Acta, Basel, 50(5):1366-72, 1967.

52. RAPOPORT, G.; DAVIS, L. & HORECKER, B.L. - The subunit structure of the fructose diphosphate aldolase from spinach leaf. Arch.Biochem.Biophys., New York, 132(1):286-93, 1969.

53. FLURI, R.; RAMASARMA, T. & HORECKER, B.L. - Purification and properties of fructose diphosphate aldolase from spinach leaves. Europ.J.Biochem., Berlin-West, 1:(1):117-24, 1967.

54. BROOKS, K. & CRIDDLE, R.S. - Enzymes of the carbon cycle of photosynthesis. I. Isolation and properties of spinach chloroplast aldolase. Arch. Biochem.Biophys., New York, 117(3):650-9, 1966.

55. HATZ, C. & LEUTHARDT, F. - Aldolases. X. Activity in cloroplasts of Spinacia oleracea. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., Berlin, 348(3):354-6, 1967.

56. DRECHSLER, E.R.; BOYER, P.D. & KOWALSKY, A.G. - The catalytic activity of carboxipeptidase degraded aldolase. J.biol.Chem., Baltimore, 234(10):2627-34 1959.

57. WINSTEAD, J.A. & WOLD, F. - The carboxyl and amino terminal residues of rabbit muscle aldolase. J.biol.Chem., Baltimore, 239(12):4212-6, 1964.

58. KOWALSKY, A. & BOYER, P.D. - A carboxypeptidase-H_2O^{18} procedure for determination of COOH-terminal resi dues and its application to aldolase. J.biol.Chem., 235(3):604-8, 1960.

59. RUTTER, W.J.; RICHARDS, O.C. & WOODFIN, B.M. - Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxipeptidase on catalytic activity. J.Biol.Chem., Baltimore, 236:3193-7, 1961.

60. SPOLTER, P.D.; ADELMAN, R.C. & WEINHOUSE, S. - Distinctive properties of native and carboxipeptidase-treated aldolases of rabbit muscle and liver. J.biol.Chem., Baltimore, 240(3):1327-37, 1965.

61. EDELSTEIN, S.J. & SCHACHMAN, H.K. - Studies on the polypeptide chains of rabbit muscle aldolase. Fed.Proc., Washington, 25(2):412, 1966.

62. SINE, H.E. & HASS, L.F. - The instability of muscle aldolase subunits in dilute alkali. J.Am.Chem. Soc., 89(7):1749-51, 1967.

63. GRAZI, E.; CHENG, T. & HORECKER, B.L - Formation of a stable aldolase - dihydroxyacetone phosphate complex. Biochem. Biophys. Res.Commun., New York, 7:250-3, 1962.

64. GINSBURG, A. & MEHLER, A.H. - Specific anion binding to rabbit muscle fructose diphosphate aldolase. Fed.Proc., Washington, 25(2):407, 1966.

65. CASTELLINO, F.J. & BARKER, R. - The binding sites of rabbit muscle aldolase. Biochem.Biophys.Res.Commun., New York, 23(2):182-7, 1966.

66. KOBASHI, K.; LAI, C.Y. & HORECKER, B.L. - Organic phos phate groups in native and borohydride-reduced aldolase. Arch.Biochem.Biophys., New York, 117: 437-44, 1966.

67. DEAL, W.C.; RUTTER, W.J. & VAN HOLDE, R.E. - Reversible dissociation of aldolase into unfolded subunits. Biochem., New York, 2(2):246-51, 1963.

68. STELLVAGEN, E. & SCHACHMAN, H.K. - The dissociation and reconstitution of aldolase. Biochem., New York, 1(6):1056-68, 1962.

69. SCHACHMAN, H.K. & EDELSTEIN, S.J. - Ultracentrifuge studies with absorption optics. IV. Molecular weight determinations at the microgram level. Biochem., New York, 5(8): 2681-705, 1966.

70. HASS, L.F. & LEWIS, M.S. - Alkali-induced structural changes in muscle aldolase. Biochem., New York, 2(6):1368-76, 1963.

71. BARANOWSKY, T. & NIEDERLAND, T.R. - Aldolase activity of myogen A. J.biol.Chem., Baltimore, 180: 543-51, 1949.

72. KAWAHARA, K. & TANFORD, C. - The number of polypeptide chains in rabbit muscle aldolase. Biochem., New York, 5(5):1578-84, 1966.

73. SIA, C.L. & HORECKER, B.L. - The molecular weight of rabbit muscle aldolase and the properties of the subunits in acid solution. Arch.Biochem. Biophys., New York, 123:186-94, 1968.

74. BÜCHER, T. - Ueber ein Phosphatübertragendes Garüngsferment. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, 1:292-314, 1947.

75. PENHOET, E.; RAJKUMAR, T.V. & RUTTER, W.J. - Multiple forms of fructose-diphosphate aldolase in mammalian tissues. Proc.Natl.Acad. Sci., Washington, 56:1275-82, 1966.

76. PENHOET, E.; KOCHMAN, M.; VALENTINE, R. & RUTTER, W.J. - The subunit structure of mamalian fructose-diphosphate aldolase.Biochem., New York, 6(9): 2940-9, 1967.

77. DAVIS, B.J. - Disk eletrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 121(2):404-27, 1964.

78. EAGLES, P.A.M.; JOHNSON, L.N.; JOYNSON, M.A.; McMURRAY, C.H. & GUTFREUND, H. - Subunit structure of aldolase: chemical and crystallographic evidence. J.Mol.Biol., New York, 45:533-44, 1969.

79. CHAN, W.; MORSE, D.E. & HORECHER, B.L. - Nonidentity of subunits of rabbit muscle aldolase. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S., Washington, 57:1013-20,1967.

80. MORSE, D.E.; CHAN, W. & HORECKER, B.L. - The subunit structure and carboxy-terminal sequence of rabbit muscle aldolase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., Washington, 58(2):628-34, 1964.

81. KOCHMAN, M.; PENHOET, E. & RUTTER, W.J. - Characterization of the subunits of aldolases A and C. Fed.Proc., Washington, 27(2):590, 1968.

82. IKEHARA, Y.; ENDO, H. & OKADA, Y. - The identity of the aldolases isolated from rat muscle and primary hepatoma. Arch.Biochem.Biophys., New York, 136(2):491-97, 1970.

83. LAI, C.Y.; GUSSIN, A.; SMITH, J.D. & HORECKER, B.L.- Sequence of the dodecapeptide from the NH_2-terminus of rabbit muscle aldolase. Arch.Biochem.Biophys., New York, 150(1):38-43, 1972.

84. LAI, C.Y.; CHEN, C. & HORECKER, B.L. - Primary structure of two COOH-terminal hexapeptides from rabbit muscle aldolase: a diference in the structure of the α and β subunits. Biochem.Biophys.Res. Commun., New York, 40(2):461-8, 1970.

85. KOIDA, M.; LAI, C.Y. & HORECKER, B.L. - Subunit structure of rabbit muscle aldolase: extent of homology of the α and β subunits and age-dependent changes in their ratio. Arch.Biochem. Biophys., New York, 134:623-31, 1969.

86. CRESTFIELD, A.M.; MORSE, S. & STEIN, W.H. - The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteina. J.biol.Chem., Baltimore, 238:622-7, 1963.

87. HARTMAN, F.C. & BARKER, R. - An exploration of the active site of aldolase using structural analogs of fructose diphosphate. Biochem., New York, 4(6): 1068-75, 1965.

88. ADELMAN, R.C.; MORSE, D.E.; CHAN, W. & HORECKER, B.L. - Evidence for a substrate-mediated change in conformation of rabbit muscle aldolase. Arch. Biochem.Biophys., New York, 126:343-52, 1968.

89. WOODFIN, B.M. - Substrate-induced dissociation of rabbit muscle aldolase into active subunits. Biochem.Biophys.Res.Commun., New York, 29(3): 288-93, 1967.

90. SCHAPIRA, G.; KRUH, J.; DREYFUS, J.C. & SCHAPIRA, F. - The molecular turnover of muscle aldolase. J.biol.Chem., Baltimore, 235(6):1738-41, 1960.

91. LAI, C.Y. & HORECKER, B.L. - Modification of rabbit muscle aldolase in vivo and in vitro. J.Cell. Physiol., Philadelphia, 76(3):381-8, 1970.

92. KUEHL, L.; SUMSION, E.N. - Turnover of several glycolytic enzymes in rat liver. J.biol.Chem., Baltimore, 245(24):6616-23, 1970.

93. PETERSON, E. A. & SOBER, H.A. - Column chromatography of proteins: substituted celluloses. Meth. Enzymol., New York, 5:3-27, 1962.

94. POGELL, B.M. - Enzyme purification by selective elution with substrate from substituted cellulose columns. Biochem.Biophys.Res.Commun., New York, 7(3):225-30, 1962.

95. VESTERBERG, O. & SWENSSON, H. - Isoeletric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Resolving power in connection with separation of myoglobins. Acta Chem.Scand., Copenhagen, 20(3):820-34, 1966.

96. LEBHERZ, H.G. - Stability of quaternary structure of mammalian and quin fructose-diphosphate aldolases. Biochemistry, 11(12):2243-50, 1972.

97. LAI, C.Y.; DRETZ, G.M.; BACILA, M.; MARINELLO, E. & HORECKER, B.L. - Labeling at the active site of aldolase with glyceraldehyde-3-phosphate and erythrose-4-phosphate, Biochem.Biophys Res.Commun., 30:6, 1968.