

25/10/91

Maria Elvira Gama Brandão

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Maria Elvira Gama Brandão e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

10.05.91

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PIROFOSFATASE
INORGÂNICA DE GERME DE MILHO

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - na área de Bioquímica.

B732p

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

CAMPINAS

1991

B732p

13992/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



Maria Elvira Gama Brandão

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PIROFOSFATASE
INORGANICA DE GERME DE MILHO

A

FLAVIA

MARIA

A G R A D E C I M E N T O S

Aos meus pais, pelo apoio, pela compreensão e pelo respeito aos meus objetivos e à minha carreira.

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, orientador da presente tese.

Ao Prof. Anibal Eugênio Vercesi, coordenador da sub-comissão de pós-graduação de Bioquímica.

A funcionária Graça pelo incentivo, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

A funcionária Gedida, pela dedicação ao nosso laboratório.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica: Cibele, Ana, Mariza, Carlos, Regina, Márcia, Silvia e Denise.

A CAPES e FAEP, pelo auxílio financeiro.

Ao casal Eliana e Luiz Cláudio, pelo zelo e pela dedicação que tiveram à redação e à impressão final desta tese.

A B R E V I A T U R A S

ATP = adenosina 5'-trifosfato

PFase = pirofosfatase

PPi = pirofosfato inorgânico

P.M. = peso molecular

SH = sulfidrila

DTT = ditioneitol

GSH = glutation reduzido

NEM = N - etilmaleimida

DTNB = ácido 5,5' - ditiobis (2 - nitrobenzólico)

Tris = tris (hidroximetil aminometano)

DEAE = dietil amino-etil

At. esp. = atividade específica

A_{280} = absorvância a 280 nm

K_m = constante de Michaelis

U = unidade de atividade enzimática

KDa = quiloDalton

R. = rendimento

P. = purificação

A_{660} = absorvância a 660 nm

I N D I C E

RESUMO	Pág. 07
SUMMARY	" 09
1. INTRODUÇÃO	" 11
2. MATERIAL e MÉTODOS	" 19
A) Ativação da resina de DEAE-celulose	" 19
B) Ativação da resina de DEAE-sephadex	" 20
C) Purificação enzimática	" 20
D) Determinação de fosfato inorgânico	" 22
E) Ensaio de atividade da pirofosfatase inorgânica	" 23
F) Efeito de substratos na pré-incubação da enzima	" 23
G) Determinação da energia de ativação	" 24
H) Determinação de proteínas	" 24
3. RESULTADOS	" 25
Purificação	" 25
Efeito da concentração de enzima	" 29
Influência no tempo de incubação	" 29
Influência do pH	" 33
Influência da temperatura	" 33

Efeito da concentração de pirofosfato	" 33
Especificidade enzimática	" 37
Efeito de ATP na atividade enzimática	" 37
Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes	" 37
Efeito de Ca^{2+}	" 37
Efeito de Ca^{2+} variando-se a concentração de Mg^{2+}	" 42
Efeito de cátions monovalentes	" 42
Efeito de poliaminas	" 42
Efeito de reagentes sulfidrílicos	" 46
Efeito de DTT	" 46
Estudos de inativação térmica da enzima	" 50
Determinação da energia de ativação	" 50
4. DISCUSSÃO	" 53
Purificação	" 53
Propriedades cinéticas	" 55
5. CONCLUSÕES	" 66
6. BIBLIOGRAFIA	" 68

R E S U M O

A pirofosfatase inorgânica foi purificada do germen de milho cerca de 174 vezes, com rendimento de 2,6%, utilizando-se centrifugações diferenciais, saturação fracionada com sulfato de amônio e cromatografias em DEAE-celulose e DEAE-sephadex.

Com a enzima parcialmente purificada foram determinadas as condições ótimas de reação de hidrólise do PPI: 2 mM PPI, 5 mM Mg^{2+} , pH = 8,3. O valor da K_m aparente obtido para o PPI foi de 59 μM .

A enzima é bastante específica para o PPI e Mg^{2+} . Observou-se que outros cátions não servem como cofatores, sendo que Ca^{2+} é um forte inibidor. Cátions polivalentes como as poliaminas também não substituem o Mg^{2+} na reação. Com relação aos cátions monovalentes, observou-se uma inibição de 40% em presença de 100 mM de Li^+ .

A reação catalisada pela pirofosfatase inorgânica de germen de milho não foi significativamente afetada por reagentes sul-

fidrílicos como o NEM e o DTNR.

FPI ou Mg^{2+} , isoladamente, não protege a enzima da inativação térmica à 55 °C.

Dois valores diferentes de energia de ativação, 10165 cal/mol e 16715 cal/mol foram obtidos utilizando-se a equação de Arrhenius.

S U M M A R Y

The inorganic pyrophosphatase was purified from maize germ about 174-fold with a 2.6% recovery, using differential centrifugations, ammonium sulfate precipitation and chromatographies on DEAE-cellulose and DEAE-sephadex.

With the enzyme partially purified it was determined the optima conditions of the PPI hydrolysis reaction: 2 mM PPI, 5 mM Mg^{2+} , pH 8.3. The apparent K_m value obtained for PPI was 59 μM .

The enzyme was highly specific in relation to PPI and to Mg^{2+} . It has been observed that other divalent cations did not serve as cofactors, and Ca^{2+} was a strong inhibitor. Mg^{2+} could not be substituted for polyvalent cations like polyamines. Among the monovalent cations tested a 40% inhibition was observed in the presence of 100 mM Li^+ .

The reaction catalyzed by maize germ inorganic pyrophosphatase was not significantly affected by sulphydrylic reagents like NEM and DTNB.

The enzyme was not protected against thermal inactiva-

tion, at 55 °C , in the presence of FPi or Mg²⁺ .

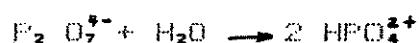
Two different activation energy values, 10165 cal/mol and 16715 cal/mol were obtained using the Arrhenius plot.

1. INTRODUÇÃO

Muitas reações metabólicas que utilizam ATP ou análogos, como fontes de energia, produzem pirofosfato inorgânico, como um dos produtos. Entre estas reações, podemos citar as biossínteses de ácidos nucleicos, catalizadas por DNA polimerases e RNA polimerases; formação de aminoacil-tRNA (na biossíntese de proteínas) e acil-Co A (na biossíntese de ácidos graxos), respectivamente, por aminoacil-tRNA sintetases e acil-Co A sintetases; o processo de bioluminescência com o sistema luciferase-luciferina; via Hatch-Slack para fixação de dióxido de carbono em plantas C4; etc.

As reações descritas acima acham-se termodinamicamente deslocadas no sentido dos produtos, devido a presença de pirofosfatases inorgânicas, enzimas largamente distribuídas nos organismos, que hidrolisam o pirofosfato inorgânico.

As pirofosfatases inorgânicas ou pirofosfato fosfohidrolases [E.C. 3.6.1.1.] catalisam a hidrólise do pirofosfato inorgânico em duas moléculas de fosfato na presença de um cátion bivalente, Mg^{2+} , como cofator (Robbins e col., 1955; Walker e Leigh, 1981).



Distribuição

As PFases inorgânicas ocorrem predominantemente no citoplasma, e sua função principal é a hidrólise de PPi, como visto anteriormente. Estas enzimas solúveis, cujos detalhes serão discutidos mais adiante, foram as mais estudadas até o momento (Butler, 1971).

Atividade de PFase também pode aparecer associada com a membrana, na conversão de energia em organelas celulares (Kleme e col., 1971). Estas PFases não possuem como função somente a hidrólise de PPi para a manutenção de um potencial eletroquímico de H⁺ através da membrana, mas também a formação de PPi a custa de energia liberada da cadeia de transporte de elétrons (Baltscheffsky e col. 1966; Baltscheffsky, 1967).

Existem referências de PFases ligadas a membrana no fungo Phytophthora infestans (Okorokov e col., 1978); na bactéria fotossintética Rhodospirillum rubrum (Baltscheffsky, 1967); em levedura (Janson e col., 1979); e em mitocôndrias e cloroplastos de várias plantas (Gould e Winget, 1973; Walker e Leigh, 1981; Kowalczyk e Maslowski, 1981; Gross e Rees, 1986; Andrews e col., 1979).

Purificação

Certamente, as PFases inorgânicas de levedura de padeiro foram as enzimas mais extensivamente estudadas. Elas foram purificadas e cristalizadas já há algum tempo por Kunitz (1952) e Heppel

(1951). Inicialmente, a levedura era submetida a uma autólise branda em suspensão aquosa alcalina de bicarbonato (Heppel, 1951) ou a uma plasmólise em tolueno (Kunitz, 1952). Posteriormente, os extratos eram filtrados, saturados com sulfato de amônio e precipitados com etanol à -4°C . Hoje, usa-se a purificação de Kunitz (1952) seguida de cromatografia em DEAE-celulose (Rapoport e col., 1972).

Geralmente, são empregados na purificação de PFases três ou mais etapas que variam bastante de uma fonte para outra. O que é semelhante na purificação, não importando a fonte, seja ela de levedura, de bactéria, de mamíferos, ou de plantas, é que se usa centrifugações diferenciais, fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias em coluna de troca-iônica (DEAE-celulose, fosfoce-lulose, DEAE-sephadex), cromatografias por filtração em gel (se-phadex).

O grau de homogeneidade, bem como, o rendimento das piro-fosfatases purificadas por diferentes métodos, é bastante variável.

Peso Molecular

As estruturas quaternárias das PFases diferem consideravelmente, dependendo da fonte da enzima.

As PFases procarióticas possuem 4 ou 6 subunidades idênticas de cerca de 20 KDa (Josse e Wrong, 1971).

Algumas PFases eucarióticas, como as de levedura de pa-

deiro, possuem 2 subunidades idênticas de 30-35 KDa por molécula.

O P.M. de PPase de animais está em torno de 68 KDa (Irie e col., 1970).

Para as PPases de plantas, o P.M. também varia de uma fonte para outra: 38 KDa para folhas de milho (Simmons e Butler, 1969); 33 KDa para as folhas de Amaranthus blitum, L. (Mukherjee e Pal, 1983); 43 KDa para as de cloroplasto de sorgo (Krishnan e Gnanam, 1988).

Substrato: complexo Mg-PPi

Lambert e Watters (1957) sugeriram que Mg^{2+} e o PPi podem formar três complexos: $MgP_2O_7^{2-}$, $Mg_2P_2O_7^0$, $MgHP_2O_7^-$. A última dessas espécies é dependente de pH e sua formação requer a protonação do $P_2O_7^{2-}$ antes da adição de Mg^{2+} in vitro (Horder, 1974). Ambos os pirofosfatos mono e di-magnésio podem ser os verdadeiros substratos das pirofosfatases in vitro. Em células intactas, supõem-se que o PPi esteja presente, como um complexo $Mg P_2 O_7^{2-}$ na proporção 1:1, devido a alta afinidade do grupo pirofosfato por cátions divalentes.

A PPase de levedura aceita ambos os complexos $Mg P_2 O_7^{2-}$ e $Mg_2 P_2 O_7^0$ como substrato (Moe e Butler, 1972).

Em bactérias, como E. coli, apenas o complexo $Mg P_2 O_7^{2-}$ é aceito como substrato pela enzima (Josse, 1966; Josse e Wrong, 1971). Este também parece ser o caso de enzimas de mamíferos, tais como as PPases de eritrócitos humanos (Thuillier, 1978), fi-

gado de rato (Horn e col., 1967) e cérebro de rato (Robbins e col., 1955).

Com relação às PFases de plantas superiores, os dados existentes sobre suas propriedades ainda não estão bem estabelecidos. As PFases de plantas aceitam ambos os complexos $Mg_2 P_2 O_7^{\ominus}$ e $Mg P_2 O_7^{\ominus}$ como substrato; no entanto algumas podem preferir o $Mg_2 P_2 O_7^{\ominus}$ (Ho e Khoo, 1985).

Especificidade enzimática

Todas as pirofosfatases inorgânicas estudadas até o momento são altamente específicas para o PFi (Butler, 1971). Constituem uma exceção as PFases ligadas a membrana que podem aceitar o ATP como substrato (Klemme e col., 1971).

O Mg^{2+} é o cátion bivalente genericamente utilizado pelas PFases inorgânicas. Entretanto, outros cátions podem aparecer como cofatores, em maior ou menor escala.

Para a PFase de levedura de padeiro, a eficiência catalítica com relação a cátions bivalentes é: $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ (Schlesinger e Coon, 1960).

Já em mamíferos, como por exemplo, fígado de rato, o Mg^{2+} é o único cátion bivalente efetivo para a ativação enzimática (Irie e col., 1970; Morita e Yasui, 1978; e Unguryte e col., 1989).

Para plantas, o Mg^{2+} , se não é o único, é o mais efetivo cátion para ativação enzimática (Bucke, 1970).

Alguns autores tem estudado os efeitos de poliaminas em reações enzimáticas dependentes Mg^{2+} (Cohen, 1971). Estas poliaminas são cátions polivalentes amplamente distribuídos na natureza, com capacidade de interagir com ácidos nucleicos e proteínas. As poliaminas espermina e espermidina mostram os mais variados efeitos nas reações de síntese da DNA e de RNA; na ativação de aminoácidos, e em outras etapas de síntese de proteínas (Tabor e Tabor, 1985).

Existem poucas referências de estudos de poliaminas em reações catalizadas por PFases inorgânicas. Espermina e espermidina podem constituir o Mg^{2+} nas reações catalizadas pela PFase de Streptococcus faecalis (Lahti e col., 1989).

Inibidores

Moe e Butler (1972) mostraram que a PFase de levedura é marcadamente inibida pelo Ca^{2+} .

Considerando o complexo $MgPPi$ como o verdadeiro substrato, o ânion PPi^{4-} é um inibidor competitivo para a PFase de E. coli (Josse e Wrong, 1971). Cátions como Zn^{2+} e o Ca^{2+} são fortes inibidores da PFase de fígado de rato (Irie e col., 1970).

Em plantas, F^{-} , Ca^{2+} e outros cátions bivalentes, uréia, EDTA, citrato, cianeto, tungstato e sais de Li^{+} e Na^{+} são inibidores da PFase em maior ou menor proporção, dependendo da fonte.

Algumas PFases que possuem grupamentos sulfidrílicos, devido ao aminoácido cisteína, são inibidas por sais de ferro ou por

agentes oxidantes suaves. Isto sugere que tais grupos SH são essenciais na manutenção da atividade catalítica da enzima (Barron, 1951; Boyer, 1959; Jocelym, 1972; Lahti e Niemi, 1981).

Certas PPases de plantas não possuem grupamentos sulfidrílicos essenciais para a atividade enzimática.

Objetivos da tese

De modo geral, os estudos de enzimas a partir de vegetais não estão bem estabelecidos, provavelmente devido a complexidade desses organismos.

A presente tese contém dados referentes a purificação e propriedades cinéticas de uma pirofosfatase inorgânica de germen de milho. Selecionou-se o milho como material de partida, devido à sua disponibilidade em variedades já bem estabelecidas.

No germen de milho ou embrião está toda gama de material necessária para o desenvolvimento da planta, em estado estacionário. Quando o germen é colocado em condições adequadas de luz, umidade, temperatura, etc, começa a se desenvolver, e portanto, a ocorrer síntese de DNA e RNA, síntese de aminoaçúcares, síntese de lípidios, síntese proteica, etc. Como a PPase atua concomitantemente com todas estas reações, a sua atividade também deve estar aumentada.

Com a enzima parcialmente purificada do germen de milho, utilizando-se centrifugações diferenciais, fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias em DEAE-celulose e DEAE-sephadex,

estudamos as condições ótimas de ensaio, especificidade enzimática, efeito de poliaminas e reagentes sulfidrílicos. Estudos de inativação térmica e determinação da energia de ativação estão também descritas na presente tese.

2. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Os milhos (Maya normal) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Willian José da Silva, do Departamento de Genética, Instituto de Biologia - UNICAMP.

ATP, DTT, GSH, B-mercaptoetanol, DTNB, poliaminas, DEAE-celulose, DEAE-sephadex e glicerol foram obtidos da Sigma Chemical Company (U.S.A.).

PCMB, NEM foram adquiridos da Research Laboratories Inc.(U.S.A.).

MÉTODOS

A) Ativação da resina de DEAE-celulose segundo Peterson e Sober(1962):

A resina comercial foi misturada com NaOH 1N, agitada e

filtrada a vácuo. A seguir, lavou-se a resina com água destilada, várias vezes, até atingir-se o pH da água. Posteriormente, tratou-se a resina rapidamente com HCl 1N. Também filtrou-se a vácuo e lavou-se várias vezes com água destilada. Novamente a resina foi misturada com NaOH 1N, filtrada e lavada várias vezes com água destilada. A resina foi guardada à 4° C e misturada com algumas gotas de n-butanol como preservante.

B) Ativação da resina de DEAE-sephadex:

A DEAE-sephadex 50 foi deixada em água destilada por três horas. Decantou-se e lavou-se a resina várias vezes com tampão Tris/acetato 50 mM pH 6,8.

C) Purificação enzimática:

Sementes de milho foram deixadas em água destilada por duas horas, separando-se a seguir os germens com o auxílio de uma espátula. Os germens foram colocados em nitrogênio líquido e triturados em almofariz à 4° C em presença de tampão Tris/HCl (pH 8,0) 50 mM contendo sacarose 0,44 M, glutathiona reduzida 1mM, polivinilpirrolidona 1% e Na₂ SO₃ 0,2%, numa proporção de 4:1 da amostra.

Todas as etapas a seguir foram realizadas à 4° C.

Filtrou-se o homogeneizado obtido em gaze, dobrada quatro vezes, e o filtrado foi centrifugado à 15000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação à 7500 x g

também por 10 minutos. Para ambas as centrifugações, utilizou-se a centrífuga Sorvall. Para separar o microsomo utilizou-se o método descrito por Lamaire e col. (1969): o sobrenadante de 15000 x g foi precipitado com cloreto de bário até uma concentração final de 0,02 M, sob agitação por 5 minutos, e centrifugado à 15000 x g, por 15 minutos.

Fracionou-se, então, o sobrenadante desta centrifugação à 20-85% de sulfato de amônio. A cada adição de sal, deixou-se agitando por 1 hora, e logo após centrifugou-se à 15000 x g, por 10 minutos. Na última centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido no menor volume de Tris/HCl 0,1 M (pH 8,3) contendo 1 mM de GSH.

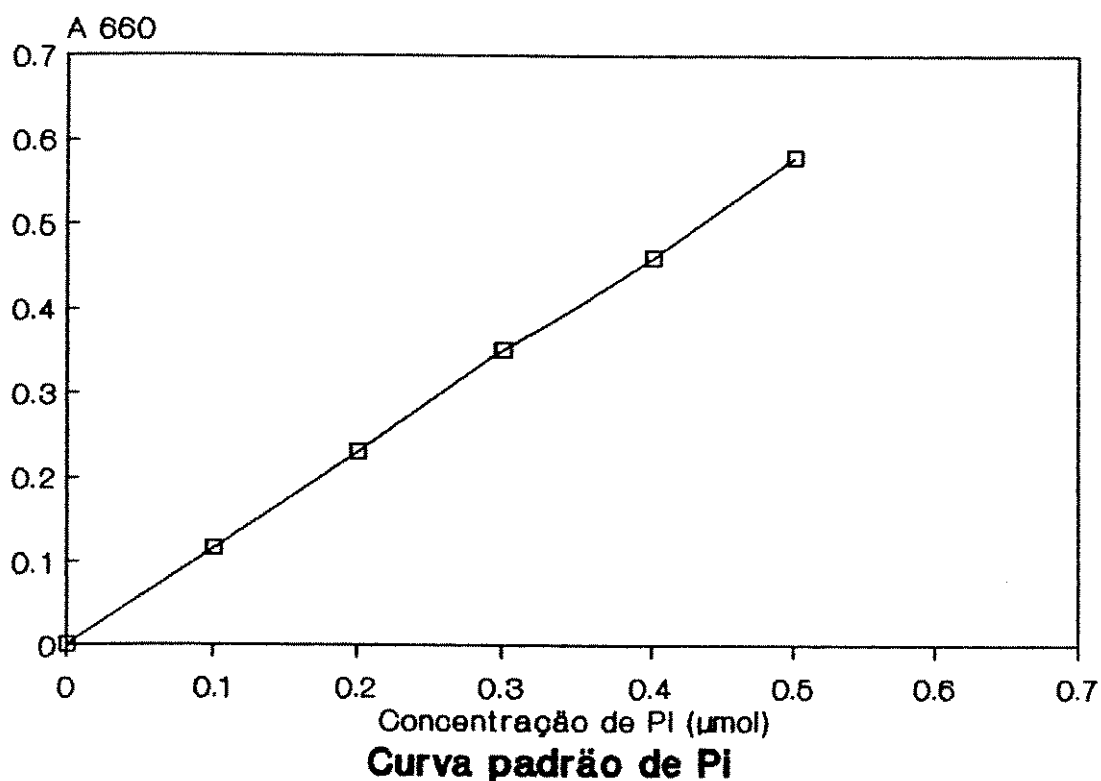
Dialisou-se o extrato bruto contra tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de GSH, e aplicou-se a uma coluna de DEAE-celulose (6 x 22 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão de diálise. Lavou-se a coluna com o tampão de diálise e equilíbrio. Eluiu-se a enzima com a passagem de um gradiente linear de cloreto de potássio de 0 à 0,8 M (1000 ml) no tampão acima. Nas frações coletadas foram determinados o teor proteico (A_{280}) e atividade enzimática. As frações com atividade foram reunidas e precipitadas com 85% de sulfato de amônio.

A fração eluída da DEAE-celulose foi dialisada contra tampão Tris/HCl 50 mM (pH 6,8) e aplicada a uma coluna de DEAE-sephadex (2,6 x 19 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão de diálise. Lavou-se a coluna com o tampão de diálise e eluiu-se a enzima pela passagem de um gradiente linear de cloreto de potássio de 0 à 0,8 M (600 ml) no tampão acima. Nas frações coletadas foram

determinados o teor proteico (A_{280}) e atividade enzimática. As frações com atividade foram reunidas e precipitadas com 85% de sulfato de amônio.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de fosfato inorgânico em 15 minutos.

D) Determinação de fosfato inorgânico:



O fosfato inorgânico foi determinado de acordo com o método de Fiske-Subbarow modificado por Summer (1944). O método baseia-se na formação de um complexo colorido (Azul de molibdênio) por redução de fosfomolibdato de amônio em presença de Fe^{2+} como redutor. A solução contendo fosfato adicionou-se 1 ml de molibdato de amônio 2,5% em H_2SO_4 4N e 0,5 ml de sulfato ferroso 10% em ácido sulfúrico 0,1 N. A absorbância foi lida em 660 nm após 15 minutos à temperatura ambiente. (Vide Curva Padrão de fosfato na página anterior).

E) Ensaio de atividade da pirofosfatase inorgânica:

A mistura de incubação (1 ml) contém 100 mM de Tris/HCl (pH 8,3), 2 mM de pirofosfato de sódio e 5 mM de acetato de magnésio. A reação foi iniciada pela adição de 66 ug de enzima, incubando-se por 15 minutos à 37° C. Paralizou-se a reação pela adição de 0,5 ml de ácido sulfúrico 0,5 N. A concentração de Pi foi determinada como descrito acima, adicionando-se 1 ml de molibdato de amônio e 0,5 ml de sulfato ferroso.

F) Efeito de substratos na pré-incubação da enzima:

A enzima foi pré-incubada à 55° C em vários tempos, na ausência e na presença de substratos. Após cada tempo de pré-incubação, o tubo era colocado em gelo.

A atividade enzimática foi determinada após a adição dos

demais reagentes, necessários, de acordo com o item E.

G) Determinação da energia de ativação:

A energia de ativação da reação catalizada pela PFase inorgânica de germen de milho foi determinada utilizando-se a equação de Arrhenius. Para tanto, seguiu-se a velocidade enzimática (em vários tempos) para três temperaturas que diferenciam entre si de 10° C (27°, 37°, 47° C).

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item E.

H) Determinação de proteínas:

As proteínas foram determinadas pela leitura de A_{280} (frações eluídas de cromatografias em coluna), e pelo método do Biureto, de acordo com Layne (1957).

3. RESULTADOS

Purificação

A PPase inorgânica foi purificada de germen de milho cerca de 174 vezes com um rendimento de 2,6% por uma série de etapas, como pode ser observado na Tabela I. Comparando-se a quantidade de proteínas totais presentes no extrato com o teor proteico após a saturação com sulfato de amônio à 85% verificou-se que aproximadamente 11% das proteínas totais são eliminadas durante estas operações, facilitando a etapa seguinte que é a cromatografia em DEAE-celulose.

O perfil cromatográfico da PPase em DEAE-celulose pode ser observado na Fig. 1. Em termos de proteínas (A_{280}) a figura mostra três picos. O primeiro é representado pelas proteínas que não se fixam à resina. Após a aplicação do gradiente linear de cloreto de potássio, dois picos proteicos com atividade enzimática são observados. Este perfil não é constante em todas as purificações efetuadas, sendo que na maioria das purificações, aparece um único pico de atividade como mostra a Fig. 2. Com relação à ativi-

TABELA, I

Purificação da PPase inorgânica de germen de milho a partir de 63 g do germen como descrito em Material e Métodos (item C).

Frações	Vol. (ml)	Ut. (U)	Prot. (mg/ml)	At. ESP. (U/mg)	Rend. (%)	Purific. (vezes)
Extrato	200	24143	490	0,2	100	1
ppt 85% (NH ₄) ₂ SO ₄	10	2236	52	4,3	9,2	21,5
DEAE- celulose	4	1273	20	15,9	5,3	79,5
DEAE- sephadex	3	628	6	34,8	2,6	174

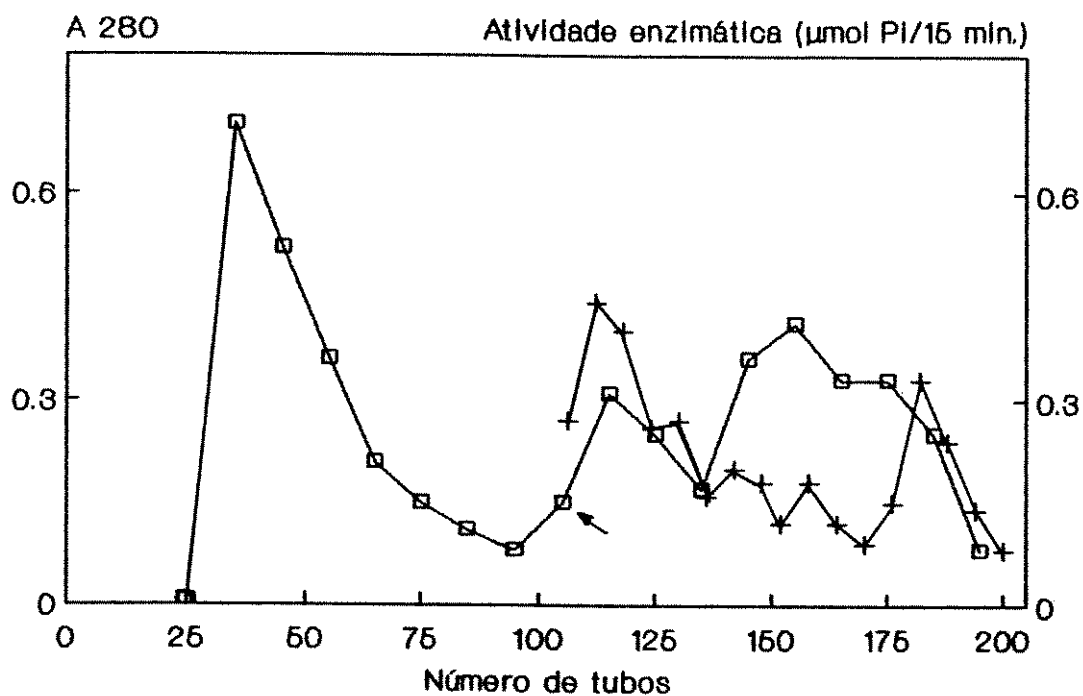


Figura 1 - Cromatografia em DEAE-Celulose

Conforme descrito em Material e Métodos (item E), o material dialisado contendo 520 mg de proteínas foi aplicado em uma coluna de DEAE-celulose (6 x 22 cm). A enzima foi eluída com um gradiente de cloreto de potássio a partir do ponto indicado na figura. Foram coletadas frações de 10 ml e determinadas a concentração de proteínas A₂₈₀ (□) e a atividade enzimática (+).

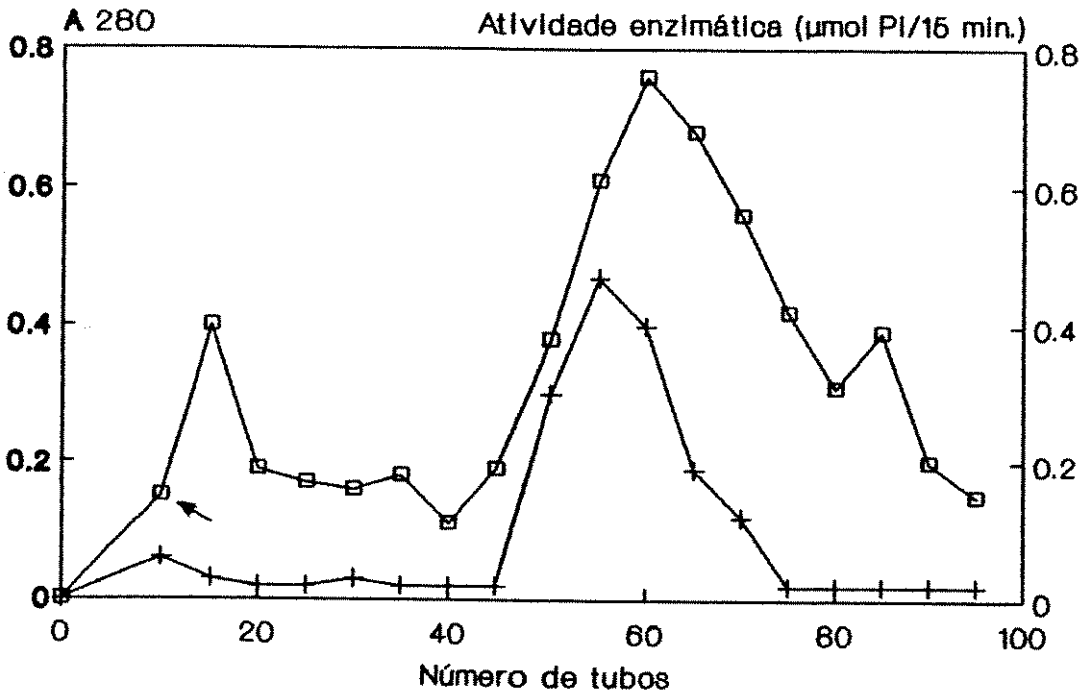


Figura 2 - Cromatografia em DEAE - Celulose

As condições experimentais são as mesmas descritas na legenda da Fig. 1.

dade específica, esta etapa fornece um pequeno aumento como indica a Tabela I.

A Fig. 3 mostra o perfil cromatográfico da PFase em DEAE-sephadex, obtendo-se um único pico de atividade enzimática. Esta etapa forneceu uma purificação cerca de duas vezes em relação à etapa anterior, como se pode observar na Tabela I.

O armazenamento à -20°C permitiu manter a atividade enzimática por pelo menos seis meses (fração eluída de DEAE-celulose), ou por 2 meses (fração eluída de DEAE-sephadex).

Efeito da concentração de enzima

Na Fig. 4 observa-se que a velocidade da reação enzimática aumenta linearmente até cerca de 180 μg de enzima no ensaio. Nos ensaios posteriores serão utilizados 66 μg de enzima.

Influência no tempo de incubação

Observa-se na Fig. 5 que, à medida que se aumenta o tempo de incubação, a velocidade de reação aumenta linearmente até pelo menos 20 minutos. Para os experimentos posteriores selecionou-se o tempo de 15 minutos para efeito de comparação com outros trabalhos da literatura.

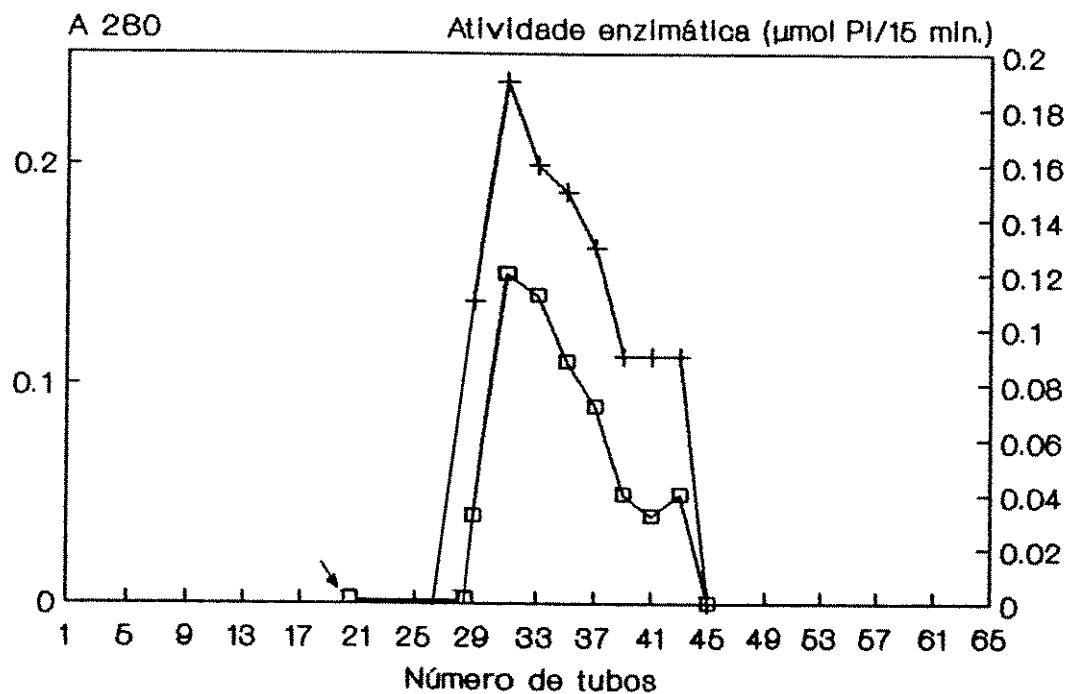


Figura 3 - Cromatografia em DEAE - Sephadex

O material proveniente da coluna de DEAE-celulose contendo 80 mg de proteínas foi aplicado à uma coluna de DEAE-sephadex (2,6 x 19 cm) conforme Métodos (item E). No ponto indicado na figura, aplicou-se um gradiente linear de cloreto de potássio para eluição da enzima. Foram coletadas frações de 3,5 ml. Proteínas (□) e atividade enzimática (+) foram determinadas nas frações eluídas.

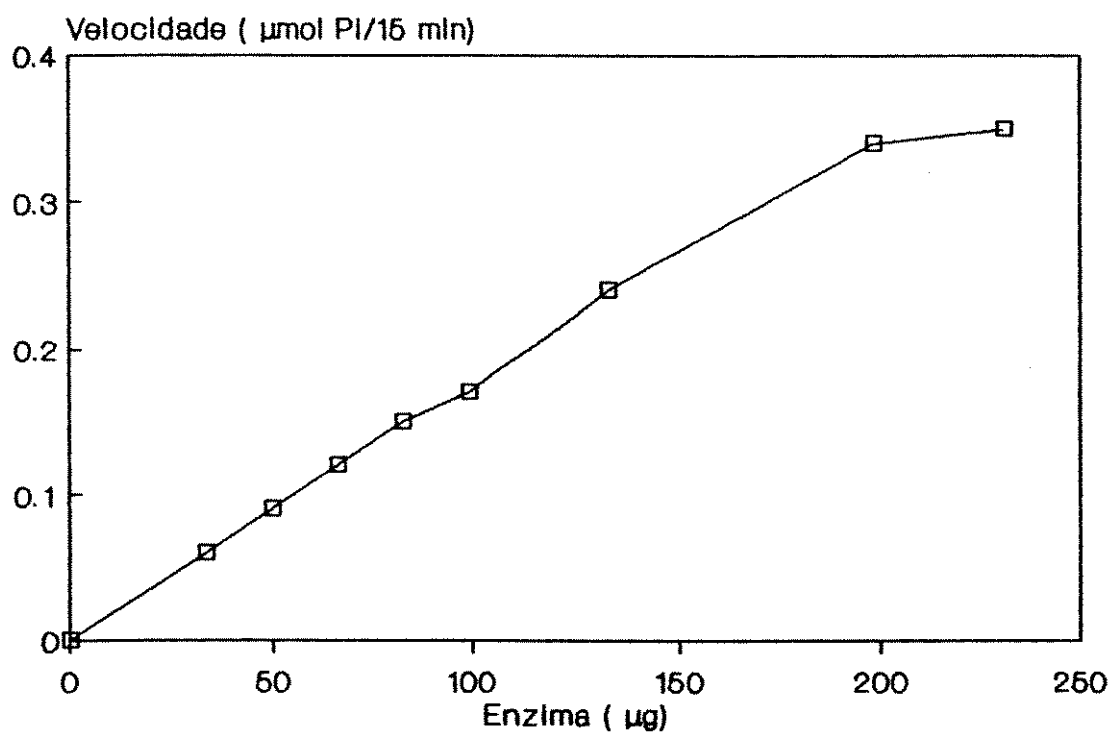


Figura 4 - Efeito da concentração de enzima na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos (item E), variando-se a concentração da enzima.

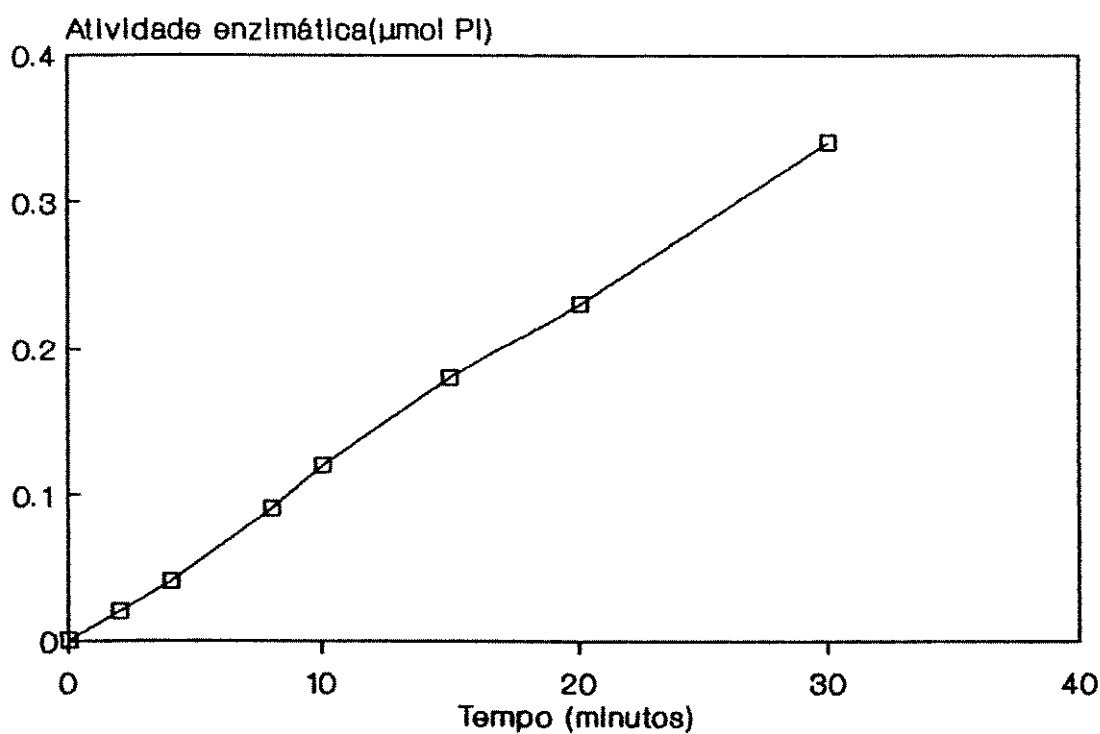


Figura 5 - Influência do tempo de incubação na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos (item E), variando-se o tempo de incubação. Para cada tempo foi feito um controle sem enzima.

Influência do pH

A Fig. 6 mostra um pH ótimo em meio alcalino. A atividade enzimática depende da espécie química do tampão utilizado. Em meio ácido não se observou atividade enzimática, quer em presença de Mg^{2+} ou Zn^{2+} .

Influência da temperatura

A Fig. 7 mostra que nas condições testadas, a atividade máxima da PFase ocorre à 50° C. A hidrólise química de PPI nas várias temperaturas estudadas, em 15 minutos não é significativa. Para fins de comparação dos nossos resultados com os obtidos em outros organismos, os demais experimentos serão realizados à 37° C.

Efeito da concentração de pirofosfato

No gráfico da Fig. 8A, pode-se observar que, à medida que se aumenta a concentração de PPI, a atividade enzimática aumenta seguindo a cinética de Michaelis-Menten com uma velocidade máxima a partir de 0,75 mM de PPI. A concentração de PPI de 2 mM será mantida nos experimentos cinéticos posteriores.

A K_m aparente do PPI foi determinada através do gráfico da Fig. 8B de Lineweaver-Burk e o valor obtido foi de 59 μM .

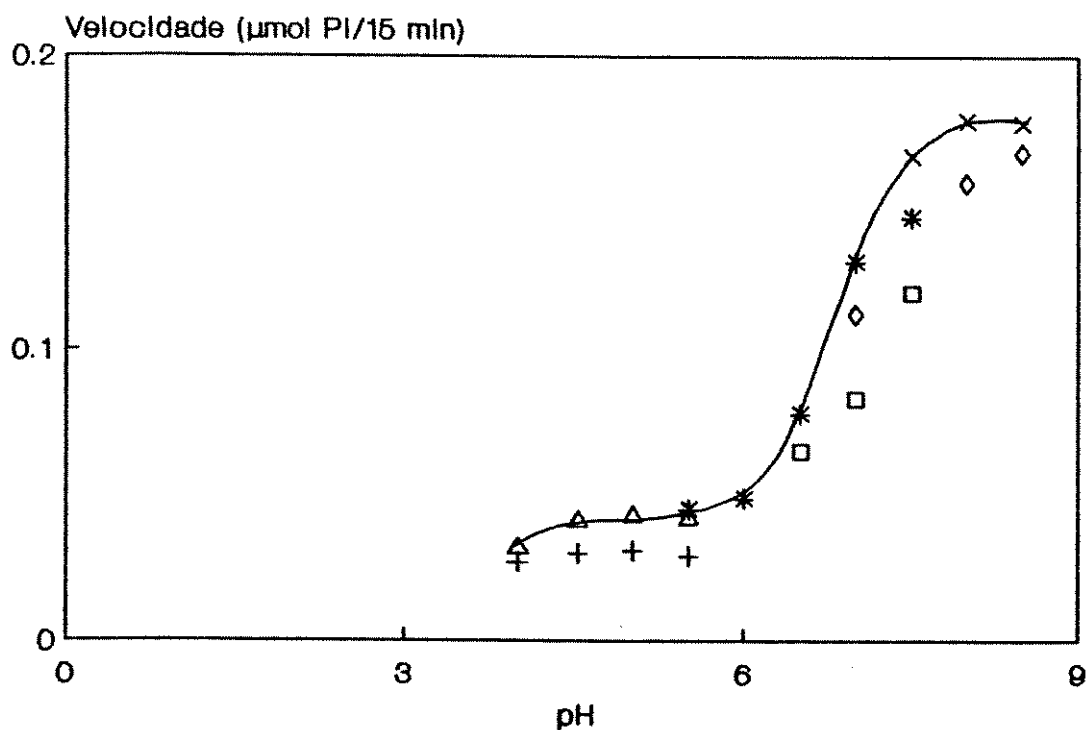


Figura 6 - Influência do pH na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos (item E), variando-se o pH. Os seguintes tampões foram utilizados na concentração de 100 mM: acetato (Δ), Bis-Tris (*), Hepes (\square), Tris (x), glicilglicina (\diamond), acetato/Zn (+).

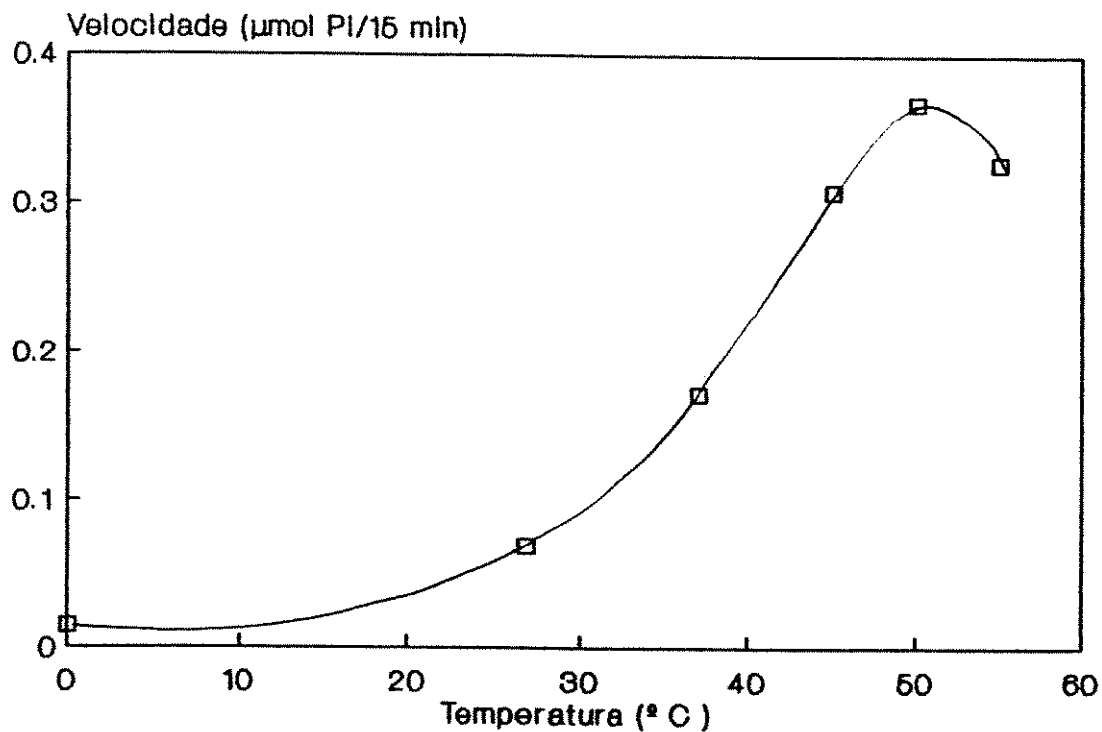


Figura 7 - Influência da temperatura na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se as temperaturas de incubação nos valores indicados. O controle para cada temperatura foi feito sem a adição de enzima.

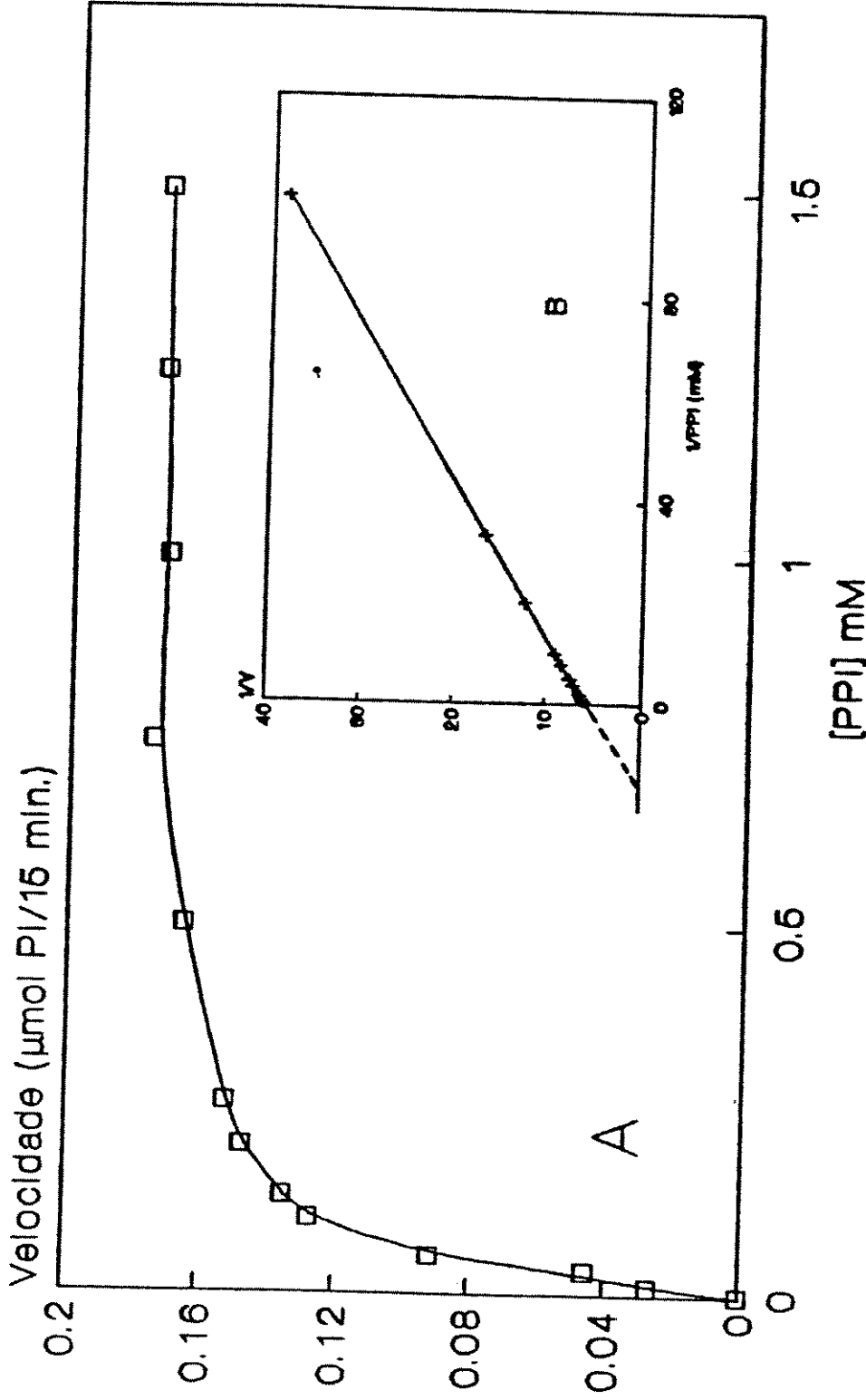


Figura 8 - Efeito da concentração de Pirofosfato inorgânico na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de PPI.

A - Michaelis Menten

B - Lineweaver - Burk

Especificidade Enzimática

A Tab. II mostra que quase nenhuma atividade foi observada quando se usou pirofosfatos orgânicos (13% para o ATP e 3% para a Tiamina-pirofosfato) como substratos para a PFase inorgânica, o que demonstra um alto grau de especificidade enzimática pelo FFi.

Efeito de ATP na atividade enzimática

A Tab. III mostra que não ocorreu alteração significativa da atividade enzimática nem com a concentração baixa de FFi e nem com a concentração do ensaio, podendo-se observar que, nestas condições, o ATP mesmo em concentração de 1mM não interfere na atividade enzimática.

Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes

A Tab. IV mostra que, com a exceção do Mg^{2+} , os demais cátions bivalentes são inativos na reação catalizada pela pirofosfatase inorgânica do germen de milho, podendo-se observar um alto grau de especificidade pelo Mg^{2+} .

Efeito de Ca^{2+}

Pode-se observar na Fig. 9, que à medida que a concentra-

TABELA II

- Especificidade enzimática em relação ao substrato -

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, sendo os substratos utilizados na concentração de 2 mM.

Substrato	Fosfato formado (umoles Pi/15 minutos)
PPi	0,174
ATP	0,023
Tiamina pirofosfato	0,005
B-glicerofosfato	0,007

TABELA III

- Efeito de ATP na atividade enzimática -

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos para três concentrações diferentes de ATP, na presença de duas concentrações diferentes de P_{Pi}.

ATP (mM)	Fosfato formado (μ moles Pi/15 minutos)	
	P _{Pi} 0,5 mM	P _{Pi} 2 mM
0	0,165	0,196
0,1	0,169	0,198
0,5	0,168	0,197
1	0,169	0,189

TABELA IV

- Efeito de cátions bivalentes na atividade enzimática -

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos para três concentrações diferentes de cátions bivalentes.

Cátion (mM)	Fosfato formado (umoles Pi/15 minutos)				
	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Sr ²⁺	Zn ²⁺
0,5	0,005	0,001	0,006	0,004	0,003
2	0,078	0,003	0,008	0,003	0,003
5	0,158	0,003	0,011	0,003	0,003

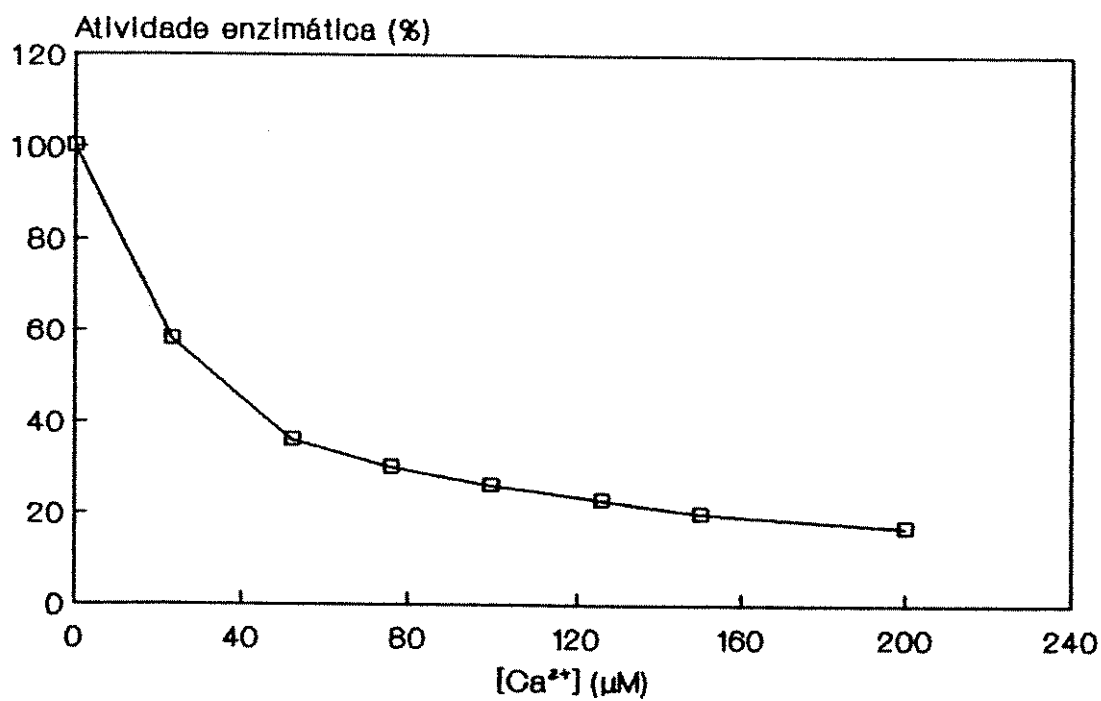


Figura 9 - Efeito de Ca²⁺ na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de Ca²⁺ em presença de 5 mM de Mg²⁺. 100% de atividade enzimática corresponde à 0,184 µmoles de Pi formado.

ção de Ca^{2+} aumenta, a atividade enzimática diminui, sendo que, com 30 μM de Ca^{2+} já ocorreu 50% de inibição da atividade.

Efeito de Ca^{2+} variando-se a concentração de Mg^{2+}

Pode-se observar na Fig. 10, que concentrações elevadas de Mg^{2+} praticamente revertem a inibição devido ao Ca^{2+} .

Efeito de cátions monovalentes

A Fig. 11 mostra que os cátions monovalentes testados não provocam efeitos apreciáveis da atividade da PPase. Dos três cátions testados, observa-se um efeito inibitório maior em presença de Li^+ (cerca de 40% para uma concentração de 100 mM).

Efeito de Poliaminas

- Efeito de espermina

Na Fig. 12 verificou-se que a espermina sozinha não atua como cofator para a PPase e quando presente junto com o Mg^{2+} na concentração de 1 mM não interfere na atividade enzimática.

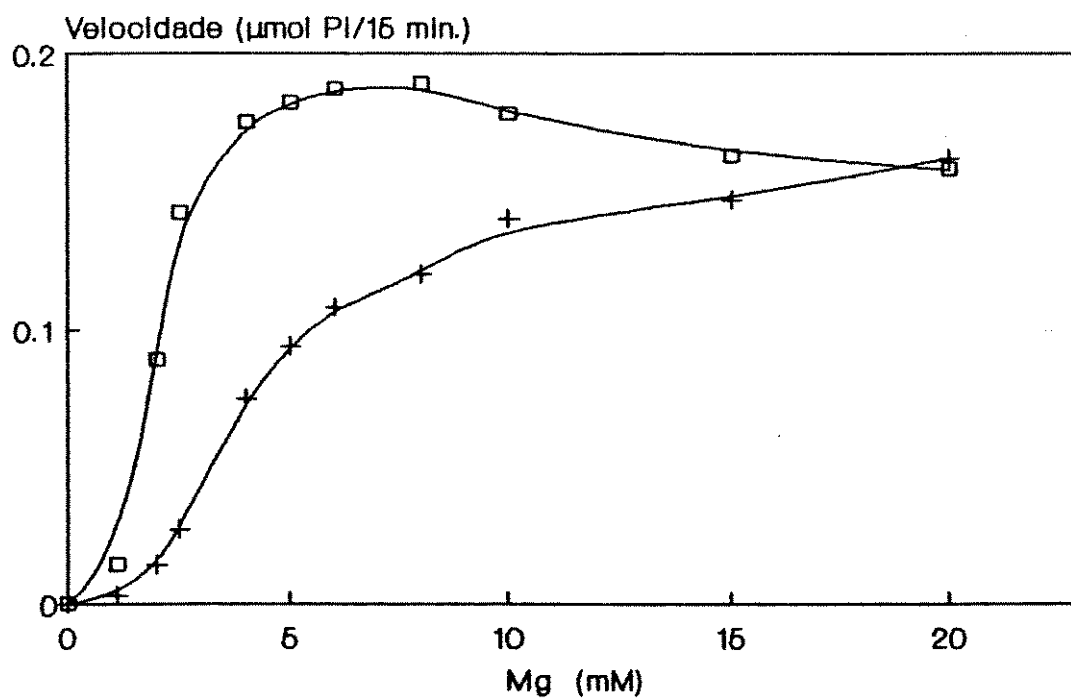


Figura 10 - Efeito de Ca^{2+} variando-se a concentração de Mg

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de Mg^{2+} na ausência (\square) e na presença de 30 μM de Ca^{2+} (+).

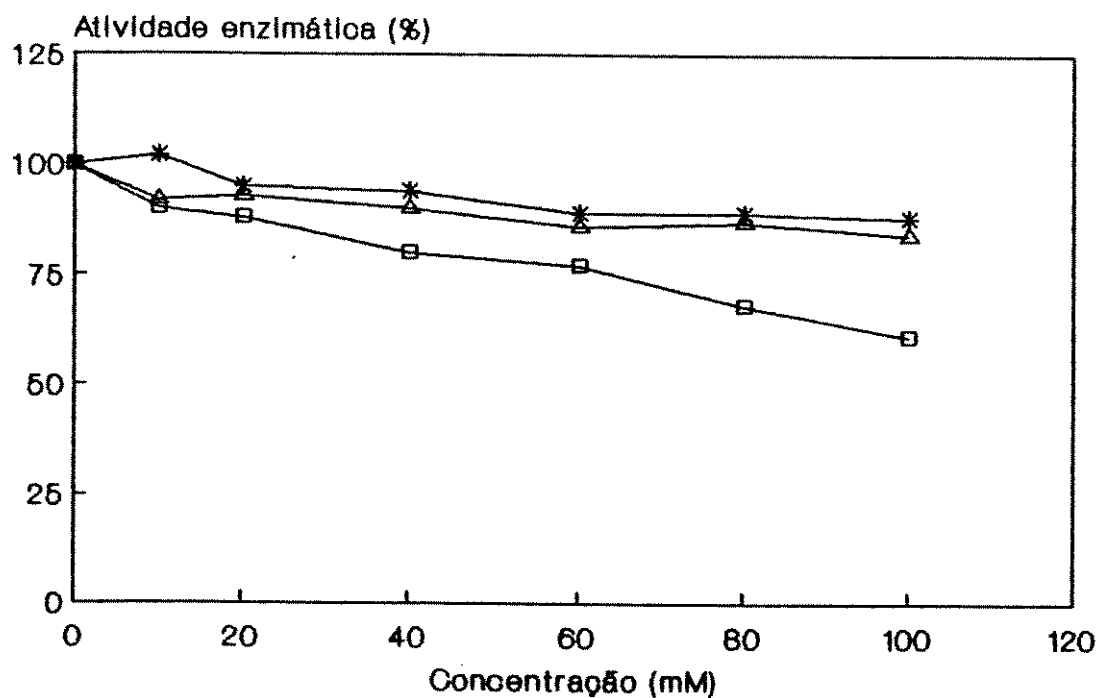


Figura 11 - Efeitos de cátions monovalentes na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, em presença de concentrações crescentes de K⁺ (*), Na⁺ (Δ) ou Li⁺ (□). 100% de atividade corresponde à 0,184 μmoles de Pi formado por 15 minutos.

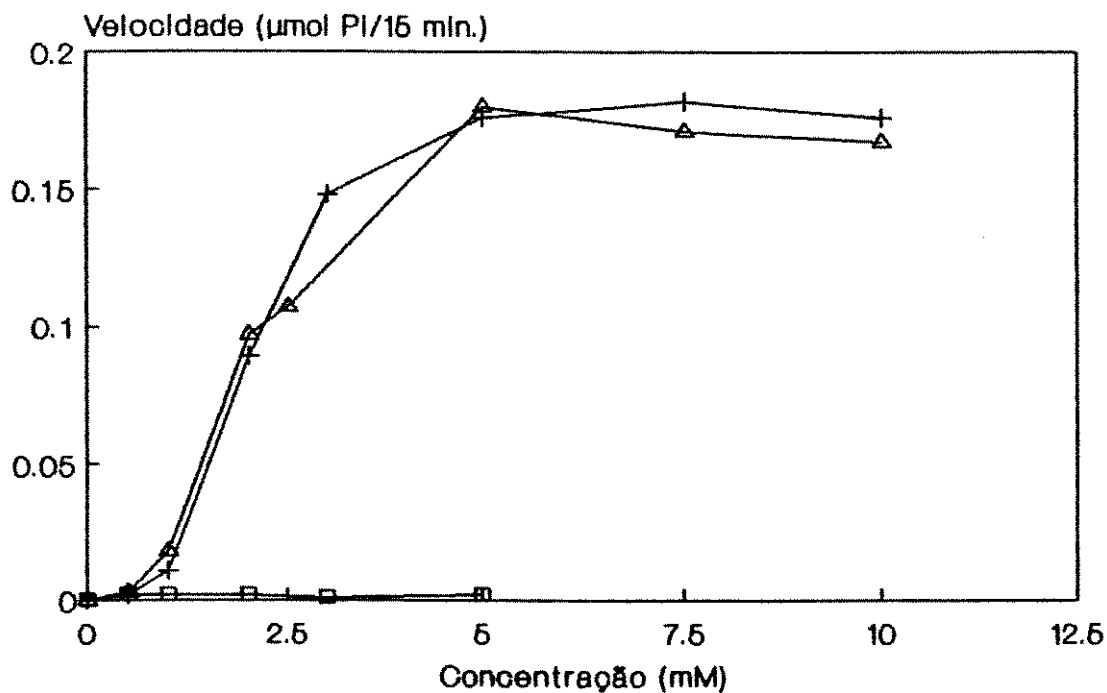


Figura 12 - Efeito de espermina na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos: a) para concentrações crescentes de Mg^{2+} na ausência (Δ) ou em presença de 1 mM de espermina (+); b) para concentrações crescentes de espermina em substituição ao Mg^{2+} (\square).

- Efeito de espermidina

Pode-se observar na Fig. 13 que da mesma forma que a espermina, a espermidina, quando sozinha não serve como cofator. Porém, diferentemente da espermina, a espermidina nas concentrações de 2 e 5 mM em presença de Mg^{2+} , provoca uma diminuição da atividade enzimática.

Efeito de reagentes sulfidrilicos

Pode-se observar na Tab. V que o NEM e o DTNB provocam uma diminuição da atividade enzimática muito pequena, cerca de 10% , e o DTT reverte esta inibição.

Efeito de DTT

Verificou-se que o DTT provoca uma diminuição da intensidade de cor de cerca de 10% no método de Fiske-Subbarrow modificado para a determinação de Pi (resultados não mostrados). Nas condições de ensaio da Fig. 14, pode-se observar que o DTT provoca uma diminuição da atividade de cerca de 30% , dos quais 10% é devido à interferência do DTT no método de coloração, como foi dito acima.

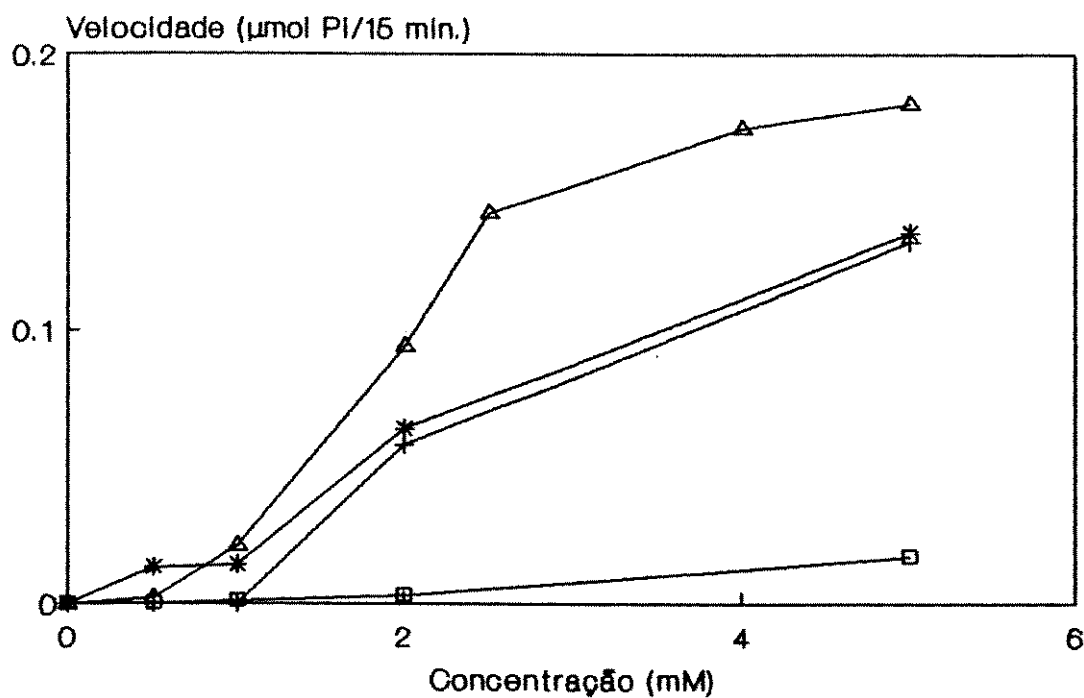


Figura 13 - Efeito de espermidina na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos: a) para concentrações crescentes de Mg^{2+} , na ausência (Δ) ou na presença de 2 mM ($+$) e 5 mM ($*$) de espermidina; b) para concentrações crescentes de espermidina em substituição ao Mg^{2+} (\square).

TABELA V

- Efeito de reagentes sulfidrílicos na atividade enzimática -

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos em presença de DTNB ou NEM nas concentrações indicadas. 100 % de atividade corresponde à 0,184 μ moles de fosfato por 15 minutos.

Adição	Fosfato formado (%)
Nenhuma	100
NEM 1 mM	88
NEM 5 mM	78
DTNB 0,3 mM	89
DTNB 0,6 mM	89
DTT 5 mM + NEM 1 mM	95
DTT 5 mM + NEM 5 mM	86
DTT 5 mM + DTNB 0,3 mM	precipita

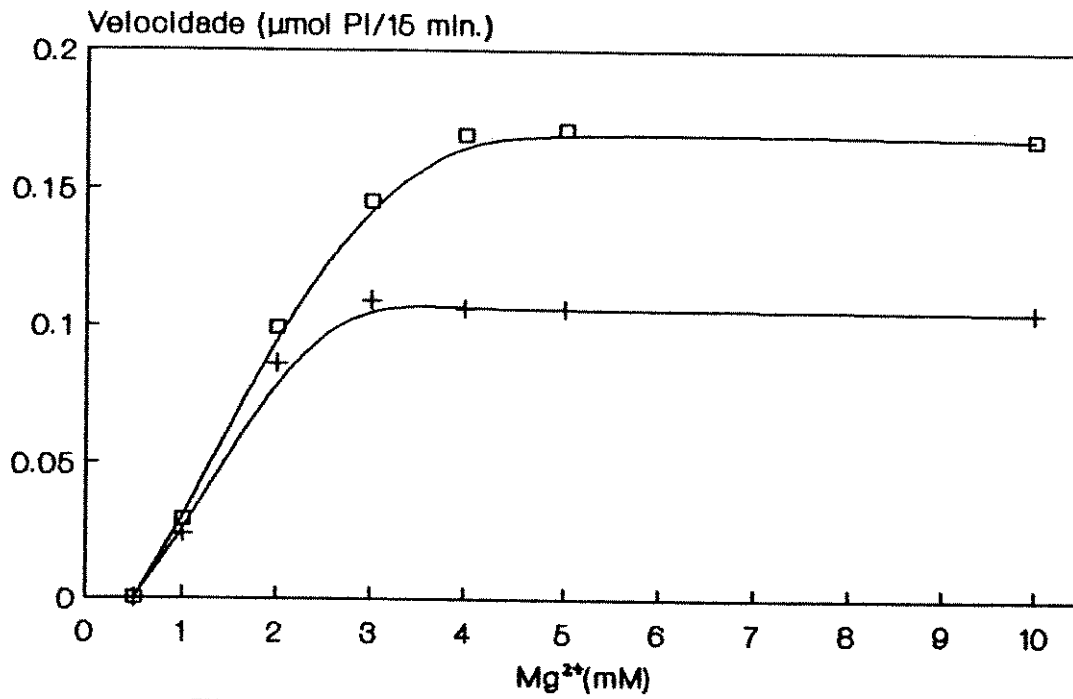


Figura 14 - Efeito de DTT na atividade enzimática

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, para concentrações crescentes de Mg^{2+} , na ausência (□) ou em presença de 5 mM de DTT (+).

Estudos de inativação térmica da enzima

A Fig. 15 mostra que a PFase inorgânica perde cerca de 40% de sua atividade à 55° C, por 15 minutos, na ausência ou em presença de PFi ou Mg²⁺, separadamente.

Determinação da energia de ativação

Na Fig. 16 observa-se um aumento na atividade enzimática, aumentando-se as temperaturas de incubação (em vários tempos).

A partir dos dados da Fig. 16 é possível determinar o valor da energia de ativação, de acordo com a equação de Arrhenius.

$$2,3 \log K_1/K_2 = - E_a/R (1/T_1 - 1/T_2)$$

onde:

K_1 = constante de velocidade, à temperatura T_1

K_2 = constante de velocidade, à temperatura T_2

E_a = energia de ativação

R = constante real dos gases (1,98/cal/mol/k)

T = temperatura absoluta

Os valores de K foram obtidos das tangentes das retas mostradas na Fig. 16.

Considerando-se as temperaturas de 27° C e 37° C:

$E_a = 10165$ cal/mol.

Para as temperaturas de 37° C e 47° C:

$E_a = 16715$ cal/mol.

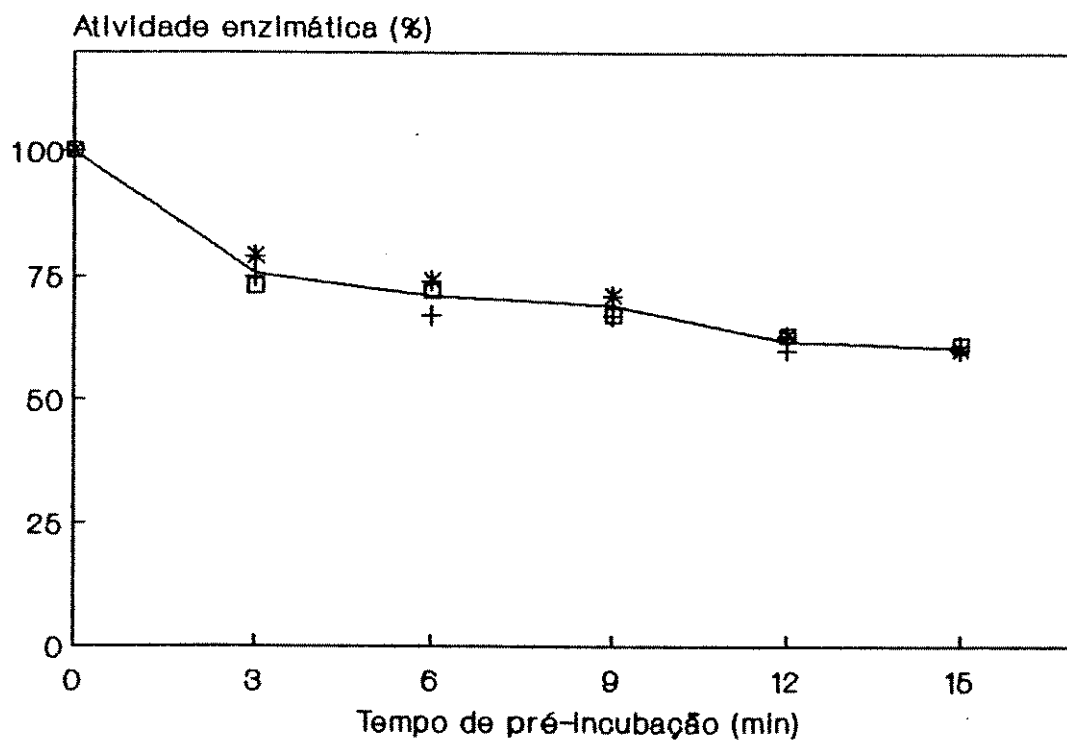


Figura 15 - Inativação térmica da enzima

A enzima é pré-incubada nos tempos indicados à 55° C, na ausência (□) ou em presença de PPi (+) ou de Mg²⁺ (*).

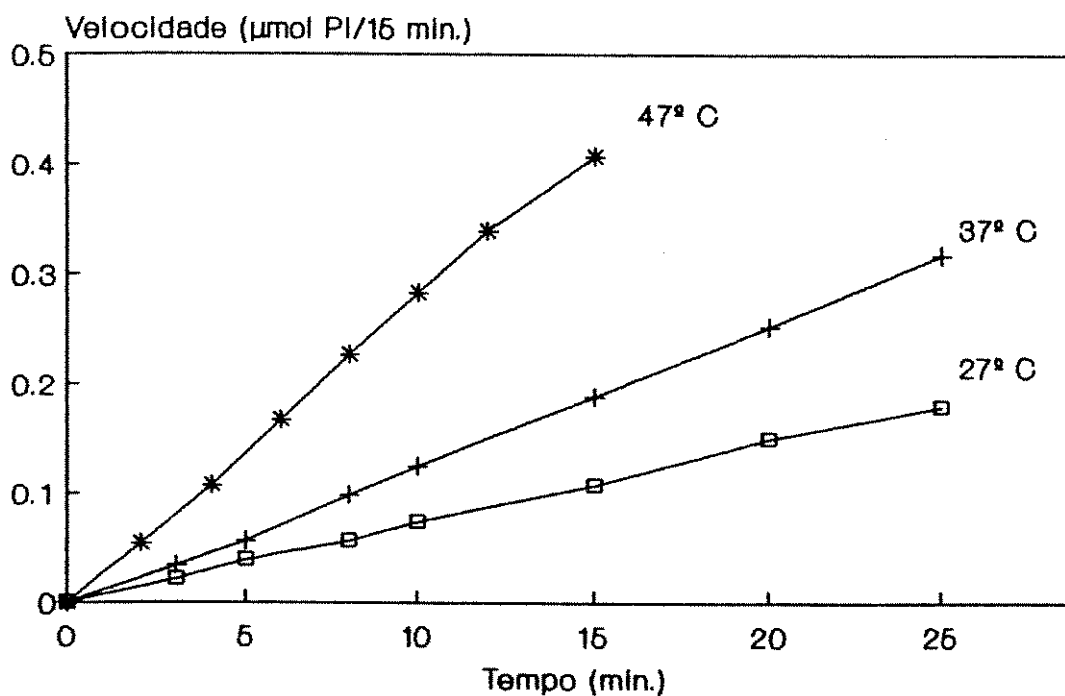


Figura 16 - Determinação da energia de ativação

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se o tempo de reação nas seguintes temperaturas: 27° C (□), 37° C (+), 47° C (*).

4. D I S C U S S A O

Purificação:

O aumento da atividade específica da PFase inorgânica alcalina durante as etapas iniciais da purificação, anteriormente a cromatografia em DEAE-celulose, foi relativamente pequeno. A presença de substratos endógenos e a grande quantidade de proteínas existentes nas frações iniciais, podem ter contribuído para este fato. A partir desta etapa cromatográfica, o aumento da atividade específica passa a ser mais significativo (Tab. I). Ao final de dois diferentes tipos de cromatografia, obtivemos uma enzima purificada 174 vezes e com um rendimento de 2,6% .

Em nossa purificação, na coluna de DEAE-celulose, obtivemos, algumas vezes, dois picos de atividade (Fig. 1) e, na maioria das vezes, um único pico (Fig. 2). Quando obtivemos dois picos, o segundo pico se mostrou bastante instável, perdendo a atividade em 2 ou 3 dias.

Rip e Rauser (1971) obtiveram um único pico de atividade em DEAE-celulose, enquanto Butler e Bennett (1969) e Bennett e

col. (1973) obtiveram dois picos de atividade. Butler e Bennett (1969) sugeriram que um dos picos podia ser originário dos cloroplastos e o outro do citoplasma. Também observaram que estes mesmos extratos possuíam uma alta atividade ácida dependente de Zn^{2+} em pH ótimo 6,2. Através de estudos cinéticos da nossa preparação com um único pico, verificamos que não existe a forma ácida junto com a FPase alcalina, portanto, isso nos leva a supor, da mesma forma que Rip e Rauser (1971) que este único pico presente em nossas purificações, representa o primeiro desses dois picos obtidos por Butler e Bennett (1969).

Em nossa purificação, uma das diferenças nas etapas, com relação a outras preparações foi a eliminação de microssomo. Normalmente, o sobrenadante pós-microssomal é obtido por centrifugação à 105.000 x g, durante 1 hora. Lemaire e col. (1969) separaram microssomo por precipitação do sobrenadante pós-mitochondrial com $BaCl_2$ a uma concentração final de 0.02 M. A opção por um desses dois métodos foi feita através de um estudo comparativo, usando um mesmo extrato celular que foi dividido em duas porções, sendo uma precipitada com $BaCl_2$ e a outra ultracentrifugada. Verificamos que a perda da atividade específica do material precipitado com $BaCl_2$ é recuperada na etapa seguinte, que é a saturação com sulfato de amônio à 85%. Por esta razão e por ser mais simples e mais rápida que a ultracentrifugação, a eliminação de microssomo por precipitação com $BaCl_2$ foi mantida.

Entre as dificuldades encontradas na purificação, constituiu-se um dos pontos críticos, a diálise do material 85% saturado. Devido à alta concentração de sulfato de amônio, a sua eliminação

por diálise não ocorre em menos de 8 horas, ainda que sucessivas trocas de tampão sejam efetuadas. Em decorrência desta prolongada diálise, frequentemente uma parte da atividade é perdida por desnaturação, sendo necessária uma centrifugação antes de realizar a cromatografia. Além disso, o Na_2SO_3 usado na extração como antioxidante, é eliminado através da membrana de diálise junto com o sulfato de amônio, podendo causar oxidação do material e perda de atividade. O GSH é usado no tampão de diálise e também no tampão em que a enzima foi dissolvida para contornar este problema, muito embora tenhamos observado que reagentes sulfidrílicos como NEM e DTNB não afetam significativamente a atividade enzimática (ver adiante).

Com relação à estabilidade da PPase inorgânica durante a purificação, verificamos que o material eluído da coluna de DEAE-sephadex é estável por cerca de 2 meses por armazenamento a -20°C .

Propriedades cinéticas:

Entre as concentrações de enzima, a escolha de 66 μg por ensaio (Fig.4), que corresponde a uma diluição de 1:30 da enzima armazenada, mostrou-se adequada, devido à redução da viscosidade e promoção de um bom índice de atividade enzimática (mais de 80% de hidrólise do pirofosfato, que é a porcentagem obtida por outros pesquisadores).

Entre os tempos de incubação estudados (Fig.5), a escolha

de 15 minutos para os ensaios posteriores foi escolhida para efeito de comparação com outros trabalhos da literatura.

O pH ótimo para pirofosfatase inorgânica do germen de milho está em torno de 8,0 - 8,5, em presença de 5mM de acetato de magnésio. Verificou-se também uma diferença significativa na atividade enzimática dependendo da espécie química do tampão, sendo o Tris-HCl, o melhor tampão para a faixa estudada (Fig.6).

Existem duas formas de PPase, uma ácida e outra alcalina. A PPase ácida é dependente de Zn^{2+} , podendo aparecer junto com a alcalina e é inibida por Mg^{2+} . Para se verificar se havia alguma PPase ácida contaminando a PPase alcalina do germen de milho, utilizou-se o tampão acetato na faixa de pH 4,0 - 5,5 e o Zn^{2+} como cofator. A enzima não apresentou atividade nestas condições, o que nos levou a supor que não há nenhuma PPase ácida junto com a PPase inorgânica alcalina do germen de milho.

A pirofosfatase inorgânica tanto do germen de milho (Fig. 6) quanto das folhas de milho (Simmons e Butler, 1969; Rip e Rausser, 1971 e Bennett e col., 1973) possui um pH ótimo em torno de 8 - 9. Também está nesta faixa o pH ótimo das enzimas das folhas de cana-de-açúcar (Bucke, 1970) e de orquídea (Ho e Khoo, 1985). Por outro lado, pirofosfatases inorgânicas de batata (Naganna e col., 1955) e de cloroplastos de espinafre (El-Badry e col., 1970) possuem um pH ótimo em uma faixa mais alcalina, 9 - 10.

Para levedura (Janson e col., 1979) e mamíferos (Irie e col., 1970; Morita e Yasui, 1978; Thuillier, 1978) a atividade da pirofosfatase inorgânica é máxima em torno de pH 7,5.

O valor da K_m aparente obtido para o PPI foi de 59 μM

(Fig.8). Este valor difere significativamente dos obtidos por Simons e Butler (1969), por Rip e Rauser (1971) e por Bennett e col. (1973) para pirofosfatases inorgânicas de folha de milho, que foi de $5,6 \times 10^{-6}$ M.

A concentração ótima de PPi pode ser discutida em função da concentração de Mg^{2+} , devido à formação de complexos entre este íon e o PPi.

O Mg^{2+} livre também age como um ativador para a PPase (Moe e Butler, 1972), enquanto o PPi livre é um forte inibidor competitivo (Gould e Winget, 1973).

Para a pirofosfatase inorgânica alcalina do germen de milho observamos que a relação Mg : PPi de 5:2 foi efetiva na reação e que tanto o Mg^{2+} , quanto o PPi são limitantes da velocidade da reação, caso estas relações não sejam mantidas (Fig. 10).

A especificidade da PPase inorgânica alcalina de germen de milho em relação ao PPi é bastante grande. Apesar dos pirofosfatos orgânicos testados (ATP e Tiamina-pirofosfato) formarem complexos com Mg^{2+} , estes não são reconhecidos pela enzima como substrato (Tab. II).

A não utilização de B-glicerofosfato como substrato pela enzima (Tab. II) sugere que a purificação de pirofosfatase inorgânica do germen de milho está isenta de fosfatase alcalina.

Todas as PPases inorgânicas citoplasmáticas estudadas mostram uma especificidade muito alta pelo pirofosfato inorgânico.

Por outro lado, as PPases particuladas, que se encontram associadas a membranas podem hidrolisar também o ATP, funcionando como ATPases para produção de energia (Kalsson, 1975).

Para a pirofosfatase inorgânica de germen de milho, o ATP não afeta a atividade enzimática (Tab. III). Já outras PFases como as de E. coli (Josse, 1966a) e do músculo esquelético de coelho (Morita e Yasui, 1978), são inibidas pelo ATP.

Um alto grau de especificidade da PFase inorgânica de germen de milho é observado com relação ao Mg^{2+} (Tab. IV). Foram usadas três concentrações diferentes de cada cátion, porque as condições ótimas de reação podem diferir de acordo com a concentração do cátion testado. PFases extraídas de folha de milho (Simmons e Butler, 1969; Rip e Rauser, 1971 e Bennett e Butler, 1973), assim como PFases extraídas de outras plantas apresentam alto grau de especificidade pelo Mg^{2+} , sendo as atividades com outros cátions bivalentes inferiores a 10% com relação à atividade obtida com o Mg^{2+} .

Para a PFase extraída da levedura de padeiro a eficiência catalítica dos metais é: $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ (Moe e col., 1972). Para algumas bactérias, o metal ativador pode ser o Zn^{2+} (Klemme e col., 1971), o Co^{2+} e ou ainda o Mn^{2+} . Em mamíferos, a PFase requer o Mg^{2+} (Morita e Yasui, 1978 e Irie e col., 1970) como metal ativador sendo o Zn^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} e Ca^{2+} inibidores da atividade.

A PFase de germen de milho é fortemente inibida pelo Ca^{2+} (Fig.9). Simmons e Butler (1969), Rip e Rauser (1971) e Bennett e col. (1973) demonstraram que a PFase extraída das folhas de milho também é fortemente inibida pelo Ca^{2+} .

Esta inibição pelo Ca^{2+} parece ser genérica para as PFases inorgânicas estudadas.

Aumentando-se a concentração de Mg^{2+} , a inibição pelo Ca^{2+} diminui, sugerindo uma inibição do tipo competitiva na reação catalizada pela PFase inorgânica do germen de milho (Fig.10).

Ca^{2+} é um inibidor acompetitivo das PFases mitocondriais de coração do boi e fígado de rato com respeito ao substrato $MgPPI$, em pH 8,5. A inibição resulta da ligação de dois íons Ca^{2+} com a enzima livre, e o complexo $[Ca^{2+} - E - Ca^{2+}]$ com o substrato (Raykov e col., 1989).

Moe e Butler (1972) também realizaram uma análise cinética semelhante dos efeitos do Ca^{2+} com a PFase de levedura de pão. O Ca^{2+} forma com o PPI , um complexo inibitório que se liga ao complexo $E - Mg^{2+}$, atuando como um inibidor competitivo.

Dos cátions monovalentes testados, apenas o Li^+ , em concentração de 100 mM, apresenta uma inibição de cerca de 40% de atividade da PFase de germen de milho (Fig.11).

Sabe-se que o K^+ estimula a PFase ligada à membrana de cotilédones de beterrabas (Kalsson, 1975), bem como a da bactéria fotossintética Rhodospirillum rubrum (Baltscheffsky e col., 1966).

Walker e Leigh (1981) mostraram que a ordem de efetividade dos cátions monovalentes testados para estimular as PFases das raízes de beterraba foi $K^+ = Rb^+ = NH_4^+ > Cs^+$. O Rb^+ também estimula a PFase ligada à membrana de cotilédones de beterraba (Kalsson, 1975).

Fisher e Hodges (1969) verificam que o Na^+ estimulava a PFase de raízes de aveia. O Na^+ também estimula em menor extensão que o K^+ a PFase ligada à membrana de cotilédones de beterraba (kalsson, 1975).

Por outro lado, Hadarag em 1970 (Karlsson, 1975) mostrou que o Li^+ e o Na^+ inibiam a pirofosfatase de eritrócitos e de cérebro, enquanto o K^+ não apresentava nenhum efeito.

Walker e Leigh (1981) observaram também que 50 mM de Li^+ inibia cerca de 44% da atividade da PFase inorgânica de raízes de beterraba. Nesta mesma concentração, Li^+ inibe apenas 20% da atividade da enzima de germen de milho (Fig.11). Levando em conta este fato e considerando que dos cátions monovalentes testados, a inibição mais significativa é causada pelo Li^+ (Fig.11), os nossos resultados sugerem que tais cátions devem ter pouca influência na atividade da PFase de germen de milho. Entretanto, resultados mais conclusivos poderiam ser obtidos através do estudo de outros cátions monovalentes; e para um mesmo cátion seria interessante estudar os efeitos de vários ânions.

Os cátions polivalentes, como poliaminas, apresentam os mais variados efeitos em reações enzimáticas dependentes de Mg^{2+} , podendo em alguns casos, substituir este cátion bivalente (Cohen, 1971).

A poliamina espermina não pode ser utilizada como cofator em substituição ao Mg^{2+} ; e quando presente junto com o Mg^{2+} , na concentração de 1 mM, não interfere com a atividade enzimática (Fig.12). Como a espermina, a espermidina também não é aceita como cofator; no entanto com 2 e 5 mM de espermidina e na presença de Mg^{2+} , a atividade enzimática diminuiu (Fig.13).

Atividade significativa em presença de 5 mM de espermina foi observada com PFase da bactéria Streptococcus faecalis, mesmo na ausência de cátions bivalentes (Lahti e col., 1989). A espermi-

dina , na ausência de Mg^{2+} , também provoca aumento na atividade enzimática (Lahti e col., 1989). Em concentrações acima de 2 mM, e na presença de 0,5 mM de Mg^{2+} , a atividade diminuiu.

O pequeno efeito inibitório de reagentes sulfidrílicos na atividade da pirofosfatase inorgânica do germen de milho (Tab.V) pode sugerir o não envolvimento direto de grupos SH na catálise enzimática.

Várias outras PPases tem se mostrado insensíveis à ação de inibidores de grupamentos SH. Entre elas podemos mencionar as enzimas de E. coli (Josse, 1966), de S. faecalis (Lahti e Niemi, 1981), de folha de milho (Simmons e Butler, 1969), de folhas de cana-de-açúcar (Rucke, 1970) e de folhas de orquídea (Ho e Khoo, 1985).

Por outro lado, algumas PPases inorgânicas como as de levedura (Bailey e Webb, 1944), as de músculo esquelético de coelho (Morita e Yasui, 1978) e as de folha de Amarantus blitun (Mukherjee e Pal, 1983) são inibidas em presença de reagentes sulfidrílicos.

O DTT reverte parcialmente a pequena inibição da atividade da pirofosfatase inorgânica do germen de milho, em presença de NEM (Tab. V).

A não reversibilidade total pelo DTT pode ser devido ao fato de que este próprio composto diminuiu a atividade da PPase do germen de milho de cerca de 30% (Fig. 14) dos quais 10% é causada pela interferência do DTT no método de coloração (resultados não mostrados).

Um substrato quando ligado à enzima, pode protegê-la da inativação térmica. Isoladamente, PPI ou Mg^{2+} , não protegem a pirrofosfatase de germen de milho de uma inativação a $55^{\circ}C$, ocorrendo uma perda de atividade de 40% já com 10 minutos de pré-incubação (Fig.15). Uma pré-incubação de PFase em presença de PPI e de Mg^{2+} não é possível devido desencadeamento da reação catalítica.

Smirnova e col. (1989) fizeram estudos cinéticos de pré-incubação com o Mg^{2+} da PFase mitocondrial e citosólica de fígado de rato e observaram que após a pré-incubação da PFase citosólica com 0,2 mM de Mg^{2+} a velocidade de hidrólise do PPI aumenta. Já com a PFase mitocondrial, a velocidade de hidrólise do PPI não depende da concentração de Mg^{2+} durante a pré-incubação indicando que no caso o equilíbrio enzima metal é um processo rápido.

Este tipo de enfoque é bastante utilizado quando a reação enzimática ocorre na presença de mais de dois substratos, como é o caso das aminoacil-tRNA sintetases que possuem como substrato o L-aminoácido, ATP e tRNA e como cofator o Mg^{2+} . Resultados de tais experimentos podem dar informações úteis sobre etapas da purificação da enzima envolvida, de qual região da molécula do substrato é importante na interação com a enzima. Assim, L-valina e seus análogos protegem a valil-tRNA sintetase de E. coli da inativação térmica (Chuang e Bell, 1972). Também a estabilidade térmica da Treonil-tRNA sintetase de fígado de rato é maior em presença de L-treonil e ATP, do que na presença desses substratos separadamente (Aoyama, 1974).

Dois valores distintos de energia de ativação foram obtidos para a PFase inorgânica de germen de milho, a partir da equa-

ção de Arrhenius, utilizando-se os dados da Fig. 16.

Isto pode indicar a existência de uma temperatura de transição, sendo algumas explicações dadas a seguir (Dixon e Webb, 1979):

- a) Mudança de fase no solvente
- b) Duas reações paralelas, com diferentes coeficientes de temperatura
- c) Um processo total envolvendo duas reações sucessivas, com diferentes coeficientes de temperatura
- d) Existência de duas formas enzimáticas de diferentes atividades
- e) Inativação reversível da enzima

Pelos padrões das curvas (Dixon e Webb, 1979), os itens d e e seriam os mais adequados para explicar os nossos resultados. Já obtivemos por várias vezes evidências cromatográficas da existência de duas formas enzimáticas em equilíbrio (Fig.1). Por outro lado, quando da obtenção de apenas um pico por cromatografia em DEAE-celulose, não podemos descartar uma inativação reversível da enzima, onde a enzima estaria em equilíbrio com uma forma inativa.

Não existem muitas referências sobre a determinação de energia de ativação de reações catalizadas por PFases inorgânicas de vegetais. Diferindo de nossos resultados, Quiroga e col. (1981), trabalhando com uma PFase ligada à parede celular da cana-de-açúcar, obtiveram um único valor de energia de ativação, 5300 cal/mol. Este valor de energia de ativação, duas a três vezes

menor que os descritos em nosso sistema, sugere que para a enzima de cana-de-açúcar, a energia necessária para atingir o estado de transição na hidrólise do pirofosfato inorgânico é menor.

Nos nossos estudos, é necessário também se levar em consideração que os valores de energia de ativação foram determinados a partir da equação de Arrhenius, utilizando-se temperaturas que diferiam entre si de 10° C. Provavelmente, resultados mais conclusivos sobre a energia de ativação poderiam ser obtidos utilizando-se o gráfico de Arrhenius, $\log. vel \times 1/T$, para o qual seriam necessárias várias temperaturas diferentes. Neste caso, uma reta bifásica no gráfico de Arrhenius indicaria a temperatura de transição, e dois valores para a energia de ativação poderiam ser obtidos.

Fazendo uma análise crítica da tese, podemos dizer que mesmo quando se parte de uma fonte para purificação da enzima, diferentes resultados podem ser obtidos, dependendo de fatores como material de partida e o método utilizado na extração. Assim, no caso do milho, um ou mais picos com atividade enzimática podem ser eluídos de colunas cromatográficas, bem como, podem ocorrer copurificação de PPases inorgânicas com atividades tanto em meio ácido, quanto em meio alcalino, dependendo do cátion bivalente utilizado, etc.

A purificação parcial da PPase descrita na presente tese foi suficiente para a determinação dos parâmetros cinéticos e outras propriedades que caracterizassem a enzima. Entretanto, para a determinação de outros parâmetros como ponto isoelétrico, peso molecular, etc, seria necessária uma enzima mais pura. Para tanto, a

quantidade de material de partida deveria ser aumentada, e cromatografias com outras resinas de resoluções mais eficazes teriam de ser utilizadas, sem mencionar a necessidade de equipamentos adequados.

Como perspectivas ou complementação do trabalho realizado, podemos mencionar entre outros, estudos de eletroforese das várias etapas de purificação; experimentos mais detalhados com relação aos efeitos de ions monovalentes e poliaminas; estudos de inibidores; estudos cinéticos em sistemas não aquosos.

Finalizando, é necessário salientar que as dificuldades encontradas na purificação de enzimas a partir de vegetais são bem maiores quando se compara, por exemplo, com sistemas de mamíferos ou bactérias.

5. CONCLUSÕES

1. A PPase inorgânica foi purificada parcialmente de germen de milho, eluindo na maioria das vezes, como um único pico da coluna de DEAE-celulose.
2. A enzima eluída de DEAE-sephadex é estável pelo menos 2 meses, em presença de sulfato de amônio 85%, à -15°C .
3. As condições ótimas obtidas para a reação catalizada pela pirofosfatase inorgânica foram: concentração de enzima menor que 150 μg /ensaio; tempo de incubação menor que 20 min.; pH ótimo em torno de 8,3; temperatura ótima em torno de 45°C ; concentração de pirofosfato inorgânico de 2 mM; concentração de Mg^{2+} de 5 mM.
4. K_m para o pirofosfato inorgânico = 59 μM .
5. A enzima é altamente específica para o pirofosfato inorgânico e Mg^{2+} .

6. Ca^{2+} compete com o Mg^{2+} pelo sítio ativo da enzima.
7. Entre os cátions monovalentes, apenas o Li^+ mostra uma certa inibição.
8. As poliaminas espermina e espermidina não substituem o Mg^{2+} na reação catalisada pela pirofosfatase inorgânica.
9. A enzima não é afetada por reagentes sulfidrílicos como NEM e DTNB.
10. Separadamente, pirofosfato inorgânico e Mg^{2+} não protegem a enzima da inativação à 55°C .
11. Foram obtidos dois valores distintos de energia de ativação para a reação catalisada pela pirofosfatase inorgânica.

6. B I B L I O G R A F I A

- ANDREWS, P.C.; SCHURIDER, F.A.; LEBRYK, D. and BUTLER, L.G.(1979). Maize leaf proteases and their effect on endogenous inorganic pyrophosphatase. *Phytochemistry* 18, 1927 - 1932.
- AOYAMA, H.(1974). Treonil-tRNA sintetase de fígado de rato. Reação de intercâmbio ATP-P_{PPi}; interação enzima - substrato; efeito de poliaminas. Tese de Doutorado - USP.
- BALTSCKEFFSKY, H.; VON STEDINGK, L.V.; HELDT, H.W. and KLINGEM-BORG, M.(1966). Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153, 1120 - 1122.
- BALTSCKEFFSKY, M.(1967). Inorganic pyrophosphate as an energy donor in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation systems. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 28, 270 - 276.
- BARRON, G.E.(1951). Thiol groups of biological importance. *Adv.*

Enzymol. 11, 201 - 266.

BAYKOV, A.A.; VOLK, S.E. and URGURYTE, A. (1989). Inhibition of Inorganic Pyrophosphatase of Animal Mitochondria by Calcium. Arch. Biochim. Biophys. 273, 287 - 291.

BENNETT, V.L.; RISTROPHE, D.L.; HAMMING, J.J. and BUTLER, L.G. (1973). Maize leaf inorganic pyrophosphatase: isozymes, specificity for substrates, inhibitors, and divalent metal ions, and pH optima. Biochim. Biophys. Acta 293, 232 - 241.

BAILEY, E.C. and WEBB, K. (1944). Inorganic pyrophosphatase of Baker's yeast. Biochem. J. 38, 394 - 398.

BOYER, P.D. (1959). Sulfhydryl and disulfide groups of enzymes. In The Enzymes (P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback, eds.). Second Ed. Academic Press, New York, Vol. 1, p. 511 - 588.

BUCKE, C. (1970). The distribution and properties of alkaline inorganic pyrophosphatase from higher plants. Phytochemistry 9, 1303 - 1309.

BUTLER, L.G. (1971). Yeast and other inorganic pyrophosphatase. In The Enzymes (P.D. Boyer, ed.) Third ed. Academic Press, Inc., New York, Vol. 4, p. 529 - 541.

BUTLER, L.G. and BENNETT, V. (1969). Phytochrome control of maize

leaf inorganic pyrophosphatase and adenylate kinase. Plant
physiol. 44, 1285 - 1289.

CHUANG, H.Y.K., BELL, F.E. (1972). Use of a thermal inactivation
technique to obtain binding constants for the E. coli valyl -
tRNA synthetase. Arch. Biochem. Biophys. 152, 502 - 514.

COHEN, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Prentice-Hall,
Englewood Cliffs, N.J.

DIXON e WEBB (1979). Enzyme Kinetics. In The Enzymes (F.D. Boyer,
ed.) Third Ed. Academic Press, Inc., New York, 175 - 181.

EL-BADRY, A.M.; BASSHAN, J.A. (1970). Chloroplast Inorganic Pyro-
phosphatase. Biochim. Biophys. Acta 197, 308 - 316.

FISHER, J.; HODGES, T.K. (1969). Monovalent Ion Stimulated Adeno-
sine Triphosphatase From Oat Roots. Plant Physiol. 44, 385 -
395.

GOULD, J.M. and WINGET, G.D. (1973). A membrane-bound alkaline
pyrophosphatase in isolate spinach chloroplasts. Arch. Biochem.
Biophys. 154, 606 - 613.

GROSS, P. and REES, T. (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase
and starch synthesis in amyloplasts. Planta 167, 140 - 145.

- HEFFEL, L.A. and HILMOE, R.J. (1951). Purification of yeast inorganic pyrophosphatase. J. Biol. Chem. 192, 87 - 94.
- HORDER, M. (1974). Complex formation of inorganic pyrophosphate with magnesium. The influence of ionic strength, supporting medium and temperature. Biochim. Biophys. Acta. 358, 319 - 328.
- HO K-K., KHOO K-L. (1985). Alkaline inorganic pyrophosphatase from orchid leaves. Phytochemistry 24, 2529 - 2532.
- HORN, A.; BORNIG, H. and THIELE, G. (1967). Allosteric properties of the Mg²⁺ - dependent inorganic pyrophosphatase in mouse liver cytoplasm. Europ. J. Biochem. 2, 243 - 249.
- IRIE, M.; YABUTA, A.; KIMURA, K.; SHINDO, Y. and TOMITA, K. (1970). Distribution and properties of alkaline pyrophosphatases of rat liver. J. Biochem. 67, 47 - 57.
- JANSON, A.C.; DEGANI, C. and BOYER, P.D. (1979). The formation of enzyme bound and medium pyrophosphate and the molecular basis of the oxygen exchange reaction of yeast inorganic pyrophosphatase. J. Biol. Chem. 254, 3743 - 3749.
- JOCELYN, P.C. (1972). Biochemistry of the SH groups. Academic Press, Inc., New York.
- JOSSE, J. (1966). Constitutive inorganic pyrophosphatase of Esche-

- richia coli. I. Purification and catalytic properties. J. Biol. Chem. 241, 1938 - 1947.
- JOSSE, J. and WRONG, S.K.C. (1971). Inorganic pyrophosphatase of Escherichia coli. In The Enzymes(F.D.Boyer,ed.).Academic Press, New York, Vol. 4, p. 499 - 527.
- KALSSON, J. (1975). Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (Beta vulgaris L.). Biochim. Biophys. Acta. 399, 356 - 363.
- KLEMMER, J.H.; KLEMMER, B. and GEST, H. (1971). Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacterium. J. Bacteriol. 108, 1122 - 1128.
- KOWALCZYK, S. and MASLOWSKI, P. (1981). Effect of inorganic pyrophosphate on respiration and oxidative phosphorylation in higher plants. Phytochemistry, 20, 2611 - 2615.
- KRISHNAM, V.A. and GNANAM, A. (1988).Properties of Mg²⁺ dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from Sorghum vulgare leaves. Arch. Biochem. Biophys. 260, 277 - 284.
- KUNITZ, M. (1952). Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from Backer's yeast. J. Gen. Physiol. 35, 423 - 450.

- LAHTI, R.; HANNUKAINEN, R. and LONNBERG, H. (1989). Effects of spermine and spermidine on the inorganic pyrophosphatase of Streptococcus faecalis. Biochem. J. 259, 55 - 59.
- LAHTI, R. and NIEMI, T. (1981). Purification and properties of inorganic pyrophosphatase from Streptococcus faecalis. J. Biochem. 90, 79 - 85.
- LAMBERT, S.M. and WATTERS, J.I. (1957). The complexes of Mg²⁺ ion with pyrophosphate and triphosphate ion. J. Am. Chem. Soc. 79, 5606 - 5608.
- LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Meth. Enzymol., II, 447 - 454.
- LEMAIRE, G.; DORRIZI, M. and LABOUESSE, B. (1969). Purification of tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas. Bull. Soc. Chem. Biol. 51, 495 - 510.
- MOE, O.A. and BUTLER, L.G. (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. II Kinetics of Mg²⁺ activation. J. Biol. Chem. 247, 7308 - 7314.
- MORITA, J. and YASUI, T. (1978). Purification and some properties of a neutral muscle pyrophosphatase. J. Biochem. 83, 719 - 726.
- MUKHEERJEE, J.J. and PAL, P.R. (1983 a). An alkaline magnesium de-

- pendent inorganic pyrophosphatase from the leaf of Amaranthus blitum L. Agric. Biol. Chem. 47, 1341 - 1344.
- MUKHERJEE, J.J. and PAL, F.R. (1983 b). Multiple forms of inorganic pyrophosphatase from the leaf of Amaranthus blitum L. Agric. Biol. Chem. 47, 2973 - 2975.
- NAGANNA, B.; RAMAN, A.; VENUGOPAL, B.; SRIFATHI, C.E. (1955). Potato Pyrophosphatases. Biochem. J. 60, 215 - 223.
- OKOROKOV, L.A.; SYSUEV, V.A. and KULAEV, I.S. (1978). Pyrophosphate-stimulated uptake of calcium into the germlings of Phytophthora infestans. Eur. J. Biochem. 83, 507 - 511.
- PETERSON, E.A. and SOBER, H.A. (1962). Column chromatography of proteins: Substituted cellulose. Meth. Enzymol. 5, 3 - 27.
- QUIROGA, E.N.; MAXUD, T.; DE FLORES, E.A.; SAMPIETRO, A.R. (1981). Cell Wall Pyrophosphatase from Higher Plants. Plant and Cell. Physiol. 22, 891 - 898.
- RAPOPORT, T.A.; HOHNE, W.E.; REICH, J.G.; HEITMANN, F. and RAPOPORT, S.M. (1972). A kinetic model for the action of the inorganic pyrophosphatase from Backer's yeast. The activation influence of magnesium ions. Eur. J. Biochem. 26, 237 - 246.
- RIP, J.W. and RAUSER, W.E. (1971) Partial purification and some

properties of alkaline inorganic pyrophosphatase from Zea mays leaves. *Phytochemistry* 10, 2615 - 2619.

ROBBINS, E.A.; STULBERG, M.P. and BOYER, P.D. (1955). The Magnesium activation of pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 54, 215 - 222.

SCHLESINGER, M.J. and COON, M.J. (1960). Hydrolysis of nucleoside di- and triphosphates by crystalline preparations of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 41, 30 - 32.

SIMMONS, S. and BUTLER, L.G. (1969). Alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 172, 150 - 157.

SMIRNOVA, I.N.; UNGURYTE, A.; BAYKOV, A.A. (1989). Kinetic Models for the Action of Cytosolic and Mitochondrial Inorganic Pyrophosphatases of Rat Liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 292 - 300.

SUMNER (1944). A Method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100, 413 - 414.

TABOR, C.W. and TABOR, H. (1985). Microbial Inorganic Pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 49, 81 - 89.

THUILLIER, L. (1978). Purification and kinetic properties of human

erythrocyte Mg^{2+} - dependent inorganic pyrophosphatase Biochim. Biophys. Acta 524, 198 - 206.

WALKER, R.R. and LEIGH, R.A. (1981). Mg^{2+} - dependent, cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage root of red beet. (*Beta vulgaris* L.). Planta 153, 150 - 155.