

MARIA LAISE CHAVES VIEIRA ^{de} _{ML}

ESTUDO IMUNOQUÍMICO COMPARATIVO DAS
FOSFORILASES b DE MÚSCULO ESQUELÉTICO,
DE BATATA E DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientador; Prof. Dr. A. Focesi Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Q. S. Tahin

Departamento de Bioquímica
Campinas - São Paulo

-1974-

Aos meus pais
Ao meu marido

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

A Srta. Maria do Carmo Biajoni, pela sua dedicação e esmero nos serviços de datilografia desta Tese.

A C.A.P.E.S., pela concessão de Bolsa de Estudo durante os anos de 1972 a 1974.

A Universidade Federal do Ceará, por ter permitido nossa vinda à Campinas, possibilitando dessa maneira, de forma decisiva, o nosso aprimoramento científico.

ÍNDICE

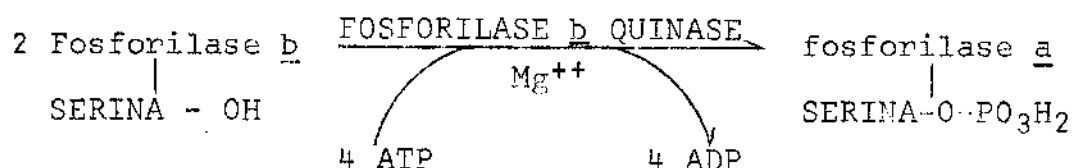
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	9
Reagentes	9
Cromatografia em Coluna de Celulose de Troca Iônica ...	9
Ensaio das Enzimas	9
Unidades de Fosforilases	10
Dosagem de Proteína	10
Purificação de fosforilase de batata	10
Purificação de fosforilase <u>b</u> de músculo esquelético de coelho	12
Purificação de fosforilase de levedura de cervejeiro ..	14
Purificação de fosforilase-fosfatase de levedura de cer vejeiro	17
Fosforilase inativa de levedura de cervejeiro	18
Eletroforese em gel de poliacrilamida	18
Imunoprecipitação e meio gelificado	19
Outros equipamentos utilizados	19
RESULTADOS	20
Purificação de fosforilase de batata	20
Purificação de fosforilase <u>b</u> de músculo esquelético de coelho	20
Purificação de fosforilase de levedura de cervejeiro ..	20
Obtenção da fosforilase inativa de levedura de cervejei ro	23
Obtenção dos antissoros	23
Especificidade dos antissoros	26
Estudos imunológicos comparativos entre fosforilase de batata, fosforilase <u>b</u> de músculo esquelético de coelho e fosforilase ativa e inativa de levedura de cervejeiro	29
DISCUSSÃO	38
RESUMO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

INTRODUÇÃO

A fosforilase (α -1,4-glucan:ortofosfato glucosil transferase E.C.2.4.1.1), enzima glicogenolítica essencial nos seres vivos, é encontrada desde em organismos unicelulares até em tecidos mais complexos como os de plantas e animais. Esta enzima foi identificada e purificada de diversas fontes como músculo, fígado, coração e outros tecidos de várias espécies animais, bem como de vegetais superiores, algas, leveduras e bactérias. Ela desempenha papel importante na regulação do metabolismo dos carboidratos e foi uma das primeiras enzimas que se mostrou existir em duas formas: uma ativa e outra inativa. A conversão de uma forma para a outra funciona como reguladora do metabolismo do glicogênio (CORI et al., 1943). A predominância de uma das formas depende da maior ou menor necessidade energética do tecido. Na célula em repouso a fosforilase b (forma inativa) predomina, enquanto que nos processos de contração muscular (tetania), ou durante o aumento da concentração de hormônios como adrenalina e glucagon, verifica-se um aumento da fosforilase a (forma ativa) (FISCHER & KREBS, 1955). A transformação da fosforilase b em a estimula a degradação do glicogênio. A via glicogenolítica tem como primeiro passo a transformação do glicogênio em glicose-1-fosfato (CORI & CORI, 1937), reação catalisada pela fosforilase.

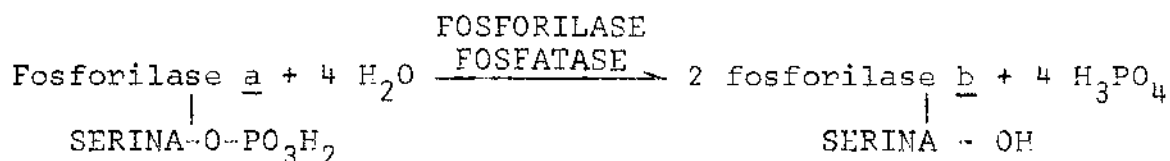
O sistema de fosforilases de músculo esquelético apresenta-se sob duas formas: fosforilase b, inativa na ausência de Adenosina-5'-fosfato (AMP) e fosforilase a, ativa mesmo na ausência desse nucleotídeo (BROWN & CORI, 1961). Tratando-se as fosforilases pelo p-cloromercuribenzoato, a fosforilase a se dissocia reversivelmente em quatro monômeros, e a fosforilase b em dois monômeros, indicando a participação dos grupos sulfidrila nas ligações dos dímeros (fosforilase b) e

tetrâmeros (fosforilase a) (MADSEN & CORI, 1956). Segundo trabalhos de SEERY et al. (1967); DE VINCENZI & HEDRICK (1967) e ULLMANN et al. (1968), foi determinado que os pesos moleculares das fosforilases a e b correspondiam a 370.000 e 185.000 daltons, respectivamente, e o monômero, 92.500 daltons. A conversão da fosforilase b de músculo esquelético em fosforilase a, ocorre através da fosforilação da proteína pelo Adenosina-5'-trifosfato (ATP), na presença de Mg^{2+} e é catalisada pela fosforilase b quinase, resultando numa modificação covalente da enzima (KREBS & FISCHER, 1956), de acordo com o esquema descrito abaixo:



OBS.: cada monômero da fosforilase é fosforilado.

A fosforilase a, por sua vez, pode se transformar na fosforilase b, em uma reação catalisada pela fosforilase-fosfatase, segundo CORI & CORI (1945) e KELLER & CORI (1955), na qual ocorre a cisão da ligação fosfato-serina da fosforilase a, em consequência, a fosforilase b formada não apresenta resíduos de fosfoserina:



Algumas propriedades são comuns a várias fosforilases enquan

to que outras diferem de acordo com a fonte de origem da enzima. Por exemplo, as fosforilases tem a capacidade de catalisar a degradação ou a síntese da ligação α -1,4-glicosídica. As fosforilases de todas as espécies de mamíferos, aves, crustáceos, bactérias e plantas superiores, contem o grupamento prostético piridoxal-5'-fosfato (PLP) (FISCHER & KREBS, 1966) que é indispensável para a atividade enzimática (BARANOWSKI et al., 1957). O PLP se encontra presente na fosforilase, na proporção de 1 mol por mol de monômero da enzima (KENT et al., 1958). A remoção deste cofator causa inativação total da fosforilase (ILLINGWORTH et al., 1958).

O papel do AMP, como ativador da fosforilase, varia de enzima para enzima. No músculo esquelético, como já referimos anteriormente, a fosforilase b não apresenta atividade fosforilásica na ausência do nucleotídeo, e a fosforilase a, embora seja ativa na ausência do AMP, este nucleotídeo causa aumento de 40% de sua atividade fosforilásica, quando ensaiada na presença daquela coenzima (FISCHER et al., 1964). De acordo com MADSEN & CORI (1957), a fosforilase a de músculo liga-se a quatro moles de AMP por mol de enzima, e a fosforilase b, a dois moles. No caso da fosforilase b, a ligação com AMP condiciona mudança na conformação da enzima, devido a modificação alostérica da proteína, tornando-a ativa.

Embora o efeito alostérico do AMP tenha sido confirmado através de inibidores da enzima (GONÇALVES & FOCESI, 1967), até o presente, ainda não foi completamente elucidado o mecanismo pelo qual o AMP se liga à fosforilase. CORI et al. (1938) descreveram que o AMP não tem efeito sobre a fosforilase de levedura, e sugeriram que a coenzima pudesse estar ligada firmemente à molécula proteica da enzima. No entanto, AIROLDI (1973), demonstrou que a fosforilase de levedura de cervejeiro não continha na sua constituição aquele nucleotídeo.

No caso de vegetais superiores, como por exemplo, a batata, o AMP também não causa nenhum efeito sobre a atividade fosforilásica e nem faz parte da molécula da enzima (LEE, 1960a).

As fosforilases de levedura se apresentam sob duas formas: ativa e inativa (FOSSET et al., 1971; SEKINO, 1974). A possibilidade de interconversão da forma ativa na inativa ou vice-versa, pelo sistema da fosforilase b quinase ou da fosforilase-fosfatase, respectivamente, foi observada com as fosforilases de levedura de cervejeiro (STREHLAU et al., 1973) e com as de levedura de padeiro (FOSSET et al., 1971). no entanto a fosforilase de batata apresenta-se sob uma forma única, a ativa, a qual não apresenta resíduo de serina-fosfato, nem sofre ação da fosforilase b quinase ou da fosforilase-fosfatase (LEE, 1960b).

Além dessas propriedades, as fosforilases também apresentam pesos moleculares diferentes entre si. O peso molecular da fosforilase b de músculo esquelético de coelho é de 185.000 daltons (SEERY et al., 1967), o da fosforilase de batata é de 207.000 daltons (LEE, 1960a) e o da fosforilase de levedura de cervejeiro é de 165.000 daltons (SEKINO, 1974). Algumas das propriedades das fosforilases de batata, de levedura de cervejeiro e de músculo esquelético de coelho, estão relacionadas na Tabela I.

Diferenças e semelhanças das fosforilases de várias origens, também puderam ser evidenciadas através de estudos imunológicos das enzimas, YUNIS & KREBS (1962), verificaram a reação de identidade imunológica entre a fosforilase b de músculo esquelético de coelho e a fosforilase b de músculo esquelético humano, quando ambas enzimas eram testadas contra antissoro de galo, preparado contra uma ou outra das duas proteínas. Entretanto, apenas uma reação de identidade parcial foi

TABELA I

Propriedades comparativas das fosforilases

ENZIMA	PLP como cofator ⁽¹⁾	Peso molecular	Ativação pela fosforilase b quinase	Inativação pela fosfori- lase fosfatase	Ativação pelo AMP
Fosforilase b de musculo esquele- tico de coelho	+	185.000 ⁽²⁾	+	..	+(8)
Fosforilase de batata	+	207.000 ⁽³⁾	..	..(6)	..(3)
Fosforilase a de levedura de cer- veja	+	165.000 ⁽⁴⁾	-	+(7)	..(9)
Fosforilase b de levedura de cer- veja	+	(?)	+(7)	..	(?)

(1) KREBS & FISCHER (1966) (4) SEKINO (1974) (7) STREHLAU et al. (1973)

(2) SEERY et al. (1967) (5) KREBS & FISCHER (1956) (8) CORI et al. (1961)

(3) LEE (1960a) (6) LEE (1960a) (9) AIROLDI (1973)

evidenciada quando as fosforilases eram testadas contra anti-soros de bode, obtidos especificamente para cada uma das enzimas. Esses autores demonstraram ainda que a presença ou ausência do AMP na fosforilase b de músculo de coelho não tinha nenhuma influência na reação imunológica entre a enzima e seu antissoro. Por outro lado, não observaram reação alguma entre o soro de galo anti-fosforilase b de músculo de coelho contra a apoenzima (isto é, na ausência do PLP que é o grupo prostético indispensável à atividade enzimática), porém quando o PLP era reconstituída na apoenzima, observaram reação positiva novamente.

YUNIS et al. (1962), usando soro caprino anti-fosforilase b de músculo esquelético de coelho, encontraram identidade imunológica com a fosforilase b de músculo cardíaco de coelho. Em 1964, BUEDING et al., observaram que soro de galo imunizado contra fosforilase b de músculo esquelético de coelho reagiu com fosforilase b de músculo esquelético de cobaia, mas não com fosforilase b de músculo liso de intestino do próprio coelho, demonstrando identidade entre enzimas de mesmo tecido de animais de espécies distintas, e diferenças entre as de tecidos diferentes do mesmo animal. Estes estudos confirmaram os achados de HENION & SUTHERLAND (1957), de que o soro de coelho anti-fosforilase b de fígado de cão, na presença de fosforilase de outros órgãos do mesmo animal, não reagia com a mesma intensidade, e, em alguns casos, havia total ausência de reação; o mesmo ocorria quando usavam o soro anti-fosforilase de coração. Trabalhos realizados por YUNIS & ASSAF (1970), demonstraram que o antissoro preparado contra fosforilase de corpo lúteo bovino dava reação de identidade imunológica com fosforilase de fígado bovino, reação de identidade parcial com fosforilase de leucócitos humanos, porém não mostrava nenhuma reação cruzada com fosforilases de músculo esquelético de coelho, humano ou bovino. Em 1971,

FOSSET et al., usando anti-corpos preparados contra fosforilase a e b de levedura de padeiro, observaram reação de identidade entre as duas formas da enzima, porém não observaram reação cruzada com fosforilase b de músculo de coelho, fosforilase b de músculo de "dogfish" ou fosforilase de fígado de coelho. Estudos imunoquímicos feitos por SATO & WEINHOUSE (1973), estabeleceram diferenças entre as fosforilases de músculo esquelético e de fígado de rato adulto.

Dessa forma não podemos generalizar o comportamento imunológico de fosforilases de diferentes tecidos de mesma espécie e nem de fosforilases de mesmo tecido de espécies distintas. Isto porque, por exemplo, como já citamos, a fosforilase do corpo lúteo bovino apresenta identidade imunológica com a de fígado bovino, mas não com a de músculo esquelético do mesmo animal (YUNIS & ASSAF, 1970); fosforilase de fígado de cão apresenta identidade imunológica com a de fígado de outros mamíferos como de coelho e gato, porém, não com a de fígado de aves, como de galo (HENION & SUTHERLAND, 1957); fosforilase b de músculo esquelético de coelho apresenta comportamento imunológico semelhante com a de cobaia, mas não com a fosforilase b de músculo liso de próprio coelho (BUEDING et al. 1964).

No presente trabalho, estudamos a fosforilase b de músculo esquelético de coelho, fosforilase de batata e fosforilase de levedura de cervejeiro como exemplos de enzimas de origem animal, vegetal e protista, respectivamente, com a finalidade de investigar as possíveis semelhanças antigênicas entre fosforilases de várias origens e entre as duas formas de fosforilase de levedura de cervejeiro.

Os estudos descritos neste trabalho sobre o comportamento imunológico comparativo entre as formas ativa e inativa da

fosforilase de levedura de cervejeiro, que diferem entre si quanto ao peso molecular e quanto ao grau de polimerização (SEKINO, 1974), visou investigar se as alterações estruturais causadas durante os processos de ativação e inativação da enzima, seriam também suficientes para modificar as propriedades antigênicas dessas proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES

O glicogênio foi preparado a partir de fígado de coelho pelo método de PFLUGER (1904), modificado por MANNERS & RYLEY (1952). A α -D-glicose-1-fosfato e a DEAE-celulose eram de procedência da Sigma Chemical Company. Outros reagentes utilizados e não discriminados, eram produtos *prô-análise* ou equivalentes, obtidos da Sigma, Merck, Backer, BDH ou Mann.

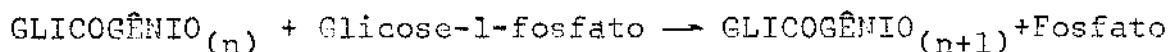
CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELULOSE DE TROCA IÔNICA

As cromatografias em dietil-amino-etil celulose (DEAE-celulose) foram realizadas com passagens sucessivas de soluções-tampão, com forças iônicas crescentes. A coluna, contendo a resina previamente equilibrada era resfriada através de maneta de vidro, com água circulando a 4°C. O eluato passava através de um monitor (Uviscan III), que detectava absorbância a 280 nm e a registrava no registrador Recti-Riter, a velocidade de 2,5 cm/hora ou 2,5 cm/minuto, dependendo da velocidade do líquido efluente da coluna. O líquido passado pelo monitor era recolhido em tubos de ensaio mantidos a 0°C no banho água-glicerina do coletor de frações (Buchler Instruments).

ENSAIO DAS ENZIMAS

As fosforilases foram ensaiadas determinando-se a quantidade de fosfato inorgânico liberado a partir da glicose-1-fosfato usando-se o glicogênio como "primer", de acordo com CORI et

al. (1955): a fosforilase catalisava a seguinte reação:



n = número de resíduos glicosil do glicogênio

Em algumas experiências com fosforilase de batata, ao invés de glicogênio, foi usado o amido como "primer", segundo o método descrito por KAMOGAWA et al. (1968).

A quantidade de fosfato liberada era determinada pela cor resultante da redução do ácido fosfomolibdico pelo ácido amino naftol-sulfônico e a leitura da absorbância era feita a 660 nm, segundo o método de LOHMANN & JENDRASSIK (1926).

UNIDADES DE FOSFORILASES

A unidade de fosforilase foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a formação de um micro mol de fosfato inorgânico liberado da glicose-1-fosfato por minuto.

DOSAGEM DE PROTEÍNA

As concentrações de proteínas foram determinadas através da reação de biureto pelo método de WEICHSELEAUM (1946), modificado por DITTERBRANDT (1948) ou pelo método de FOLIN & CIOCALTEAU (1927), modificado por LOWRY et al. (1951).

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE DE BATATA

A extração da fosforilase de batata foi feita segundo o método de LEE (1960a), modificado.

Procedimento

1. Extrato de batata - As batatas eram lavadas, descascadas e homogeneizadas em liquidificador de alta capacidade (Waring Blendor), durante um minuto, em solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 5% - citrato de sódio 5% na proporção de 100 ml da solução para cada kg de batata. O homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gazes e deixado por uma hora em geladeira (4°C). Após esta primeira etapa, todos os passos seguintes foram feitos em banho de gelo durante o fracionamento com sulfato de amônio o pH era ajustado com hidróxido de amônio.

2. Primeira precipitação com sulfato de amônio - Proteínas inertes foram removidas pela adição de 20 g de sulfato de amônio sólido para cada 100 ml do extrato de batata, livre de amido por decantação após repouso de uma hora a 4°C, em pH 6,5. Após várias horas ou uma noite em repouso, um filtrado claro foi obtido por centrifugação 10.000 x g durante 20 minutos em rotor Sorvall GSA e filtração em funil de Büchner com celite. Em seguida foram adicionados lentamente 18 g de sulfato de amônio para cada 100 ml de filtrado, mantendo-se o pH 6,5 e sob agitação contínua por mais uma hora. O precipitado foi suspenso em 50 ml da solução de sulfato de amônio 1,8M, pH 6,5, para cada kg de batata usada. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos. Este processo foi repetido por mais quatro vezes. O precipitado final foi então eluído com 50 ml de tampão citrato 0,1M pH 6,5 para cada quilo de batata usada.

3. Segundo fracionamento de sulfato de amônio - Ao eluato acima, foram adicionadas, vagarosamente, 20 g de sulfato de

amônio para cada 100 ml, mantendo-se o pH 6,5. Após centrifugação a 27.000 x g durante 20 minutos em Rotor Sorvall-SS 34 foram adicionadas 18 g de sulfato de amônio sólido para cada 100 ml do sobrenadante. O precipitado foi coletado por centrifugação e ressuspenso em pequena quantidade de tampão Tris-HCl 0,002M, pH 7,5 e dialisado contra o mesmo tampão durante dois dias. O precipitado formado durante a diálise foi centrifugado e descartado.

4. Coluna de DEAE-celulose - A solução obtida, após a diálise, na fase anterior, foi submetida a cromatografia em coluna de DEAE-celulose (30 x 1,5 cm), equilibrada previamente com tampão Tris-HCl 0,002M pH 7,5. A cromatografia foi feita com passagens sucessivas de soluções-tampão Tris-HCl 0,002M pH 7,5 contendo KCl 0,1M; 0,5M ou 1,0M; sendo coletado cerca de 2 ml (40 gotas) de eluato por tubo.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE b DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

A fosforilase b de músculo esquelético de coelho foi preparada segundo o método de FISCHER & KREBS (1962).

Procedimento

1. Preparação do extrato de músculo - Um coelho adulto era anestesiado com Nembutal e o sangue drenado pelas veias jugulares. Músculos do dorso e das patas posteriores eram cortados, pesados e moidos em máquina de moer carne, à temperatura ambiente. Para cada 100 g de músculo moido, adicionavam-se, ainda em temperatura ambiente, 100 ml de água destilada. Em seguida, a mistura era agitada durante 10 minutos, filtrada em gaze dupla e o filtrado recolhido em banho de gelo. Nesta primeira extração obtinha-se uma quantidade pequena de

filtrado. Fazia-se uma extração, colocando-se igual volume ao anterior, de água destilada (25°C), por 10 minutos e filtra-se como anteriormente. Uma terceira extração era feita adicionando-se a metade do volume anterior de água destilada. Os filtrados, reunidos em um bequer em banho de gelo, eram novamente filtrados através de algodão de vidro, para remover partículas de gordura.

2. Precipitação isoelétrica - O pH do filtrado era ajustado, para 5,1 - 5,2 adicionando-se cuidadosamente ácido acético 1,0M, mantendo-se o líquido em contínua agitação. Observava-se, então, um aumento de turvação seguida de floculação. Após repouso de 5 minutos, em banho de gelo a 0°C, removia-se o precipitado por centrifugação a 6.000 x g, em Rotor Sorvall GS-3, por 45 minutos a 0°C. O líquido sobrenadante era filtrado através de papel de filtro Whatman nº 3MM para remover resíduos e partículas em suspensão. Posteriormente, ajustava-se o pH para 6,8 pela adição de KHCO_3 sólido.

3. Precipitação com sulfato de amônio - Para cada litro do filtrado adicionava-se 700 ml de uma solução saturada de sulfato de amônio pH 6,8 obtendo-se solução a 41% de saturação. Caso o pH da mistura estivesse abaixo de 6,8, KHCO_3 sólido era adicionado para mante-lo neste pH. A mistura era deixada em repouso a 4°C e, no dia seguinte, decantava-se o sobrenadante e o precipitado era centrifugado a 6.000 x g durante 20 minutos em rotor Sorvall GS-3 (0°C). Após a centrifugação adicionava-se ao precipitado cerca de 10 ml de água destilada (25°C), para cada 150 g de músculo moído. A solução era dialisada, por uma noite (4°C), contra 8 litros de tampão Tris-HCl 0,001M pH 7,5.

4. Tratamento térmico em pH elevado - A solução de proteína dialisada, eram adicionadas as seguintes soluções:

- a) cisteína 0,3M pH 7,0 recentemente preparada, para cada uma molaridade final de 0,03M;
- b) EDTA (sal de sódio) 0,1M pH 7,0 para uma molaridade final de 0,0005M;
- c) solução de Tris 2M para elevar o pH até 8,8.

A mistura era então incubada a 37°C durante uma hora, resfriada, e, posteriormente, ajustada em pH 7,0 com ácido acético 1,0M. Se fosse observada alguma turvação, centrifugava-se a solução e eliminava-se o precipitado.

5. Cristalização e recristalização - Após a incubação da solução a 37°C e resfriamento, soluções neutras de AMP 0,1M e acetato de magnésio 1,0M eram adicionadas de modo que a concentração final dessas substâncias fossem: AMP 0,001M e Mg^{++} 0,01M. Após resfriamento a 0°C, a enzima começava a cristalizar num processo que continuava atingindo o máximo dentro de 6 horas.

Após este tempo, separavam-se os cristais por centrifugação a 8.000 x g durante 20 minutos a 0°C e dissolvia-se em 100-120 ml de cisteína 0,03M pH 7,0 (30°C), para cada 1000 g de músculo usado inicialmente. O AMP e o acetato de magnésio eram adicionados como anteriormente. Geralmente, repetia-se o processo de recristalização várias vezes.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

A fosforilase de levedura foi obtida segundo o método de AIROLDI (1973).

Procedimento

1. Preparação do extrato cru - Leveduras frescas, obtidas da cervejaria, eram lavadas várias vezes com água destilada gelada, prensada em prensa manual e postas para secar à temperatura ambiente. Após secagem, eram autolisadas em água destilada a 37°C, durante 3 horas e meia, na proporção de 3 ml de água por grama, com agitação ocasional. O autolisado era mantido a 0°C por cerca de 20 horas. A suspensão obtida era centrifugada a 6.000 x g, por 15 minutos, a 0°C em rotor Sorvall GS-3.

2. Precipitação com sulfato de protamina - Ao sobrenadante adicionava-se, lentamente e sob agitação constante, solução de sulfato de protamina a 2,5% na proporção de 10 ml para cada 100 ml de extrato cru. A agitação foi continuada por mais 20 minutos a 0°C. Após centrifugação a 27.000 x g durante 20 minutos a 0°C em rotor Sorval SS-24, o precipitado foi extraído duas vezes com solução de Tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 na proporção de 10 ml de tampão para cada 100 ml de extrato cru original.

3. Tratamento por gel de fosfato - Os eluatos do precipitado de sulfato de protamina foram misturados e tratados a 0°C, sob agitação constante, por uma solução de tampão fosfato 0,5M pH 7,2 (5 ml de tampão fosfato para cada 100 mg de proteína) e acetato de cálcio 1M (na proporção de 2,5 ml para cada 100 mg de proteínas), as quais eram adicionadas lenta e concomitantemente. A agitação foi continuada por mais uma hora e a suspensão foi então centrifugada a 27.000 x g durante 20 minutos, a 0°C.

4. Primeiro fracionamento por sulfato de amônio - O sobrenadante foi dialisado durante uma noite contra solução de tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M - sulfato de amônio 55% de saturação pH 6,5, a 0°C. O dialisado foi centrifugado a 27.000

x g durante 20 minutos e o precipitado foi dissolvido em solução tampão de citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 e dialisado contra este mesmo tampão até ausência total de sulfato de amônio. Esta solução foi diluída de modo a se obter uma concentração de proteína aproximadamente de 5,0 mg/ml.

5. Segundo fracionamento por sulfato de amônio - A solução dialisada e diluída foi submetida a nova precipitação com solução 100% saturada de sulfato de amônio pH 6,5, com agitação constante, a 0°C, até o aparecimento de turvação definida (aproximadamente 50% de saturação). Esta adição era lenta levando cerca de 3 horas. Após uma hora de repouso a 0°C a solução foi centrifugada a 27.000 x g por 20 minutos; o precipitado era rejeitado e o sobrenadante levado a 60% de saturação com solução saturada de sulfato de amônio pH 6,5, e nova turvação aparecia. Após uma hora de repouso a 0°C, ou no outro dia, a suspensão era centrifugada a 27.000 x g durante 20 minutos e o precipitado era dissolvido em tampão de citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 obtendo-se assim uma solução de fosforilase.

6. Cromatografia em DEAE-celulose - A solução de fosforilase obtida no segundo fracionamento com sulfato de amônio foi submetida a cromatografia em coluna de DEAE celulose, após diálise por cerca de 3 horas contra tampão citrato 0,01M - EDTA 0,001M, pH 6,5. A coluna de DEAE-celulose (20 x 1,5 cm) foi previamente equilibrada com o mesmo tampão e a cromatografia foi feita por passagens sucessivas de soluções de tampão citrato: 0,01M, 0,02M; 0,05M; 0,1M e 0,5M contendo EDTA 0,001M pH 6,5. O volume recolhido era cerca de 2,0 ml (40 gotas) por tubo. O pico com atividade de fosforilase era precipitado com sulfato de amônio sólido até precipitação definida. Após várias horas de repouso a 0°C, era centrifugado a 27.000 x g durante 20 minutos e o precipitado era dissolvido

em tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 e guardado em congelador.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE FOSFATASE DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

A fosforilase fosfatase paricalmente purificada foi obtida segundo o método de STREHLAU et al. (1973).

Procedimento

1. Preparação do extrato bruto - Leveduras de cervejeiro secas eram autolisadas em água destilada na proporção de 3 ml/g durante 3 horas e meia a 37°C. Após centrifugação a 27.000 x g por 15 minutos a 0°C, o sobrenadante era dialisado contra água destilada durante 20 horas a 4°C.

2. Precipitação com sulfato de protamina - O dialisado era tratado com uma solução de sulfato de protamina a 2,5%, usando-se 10 ml para cada 100 ml do extrato bruto, sob agitação constante. O precipitado obtido por centrifugação a 27.000 x g durante 15 minutos, foi extraído duas vezes com tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5, na proporção de 1:9 do volume do extrato bruto.

3. Tratamento com gel de fosfato - Os eluatos do precipitado de sulfato de protamina foram misturados e ajustados para pH 6,0 com ácido acético. Em seguida, era adicionado, lentamente, sob agitação constante, gel de fosfato de cálcio envelhecido, na proporção de 1 ml por mg de proteína, continuando-se a agitação por mais 1 hora a 4°C. Após centrifugação a 27.000 x g durante 30 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante concentrado por diálise à vácuo a 4°C. A so

lução obtida foi dialisada contra EDTA 0,001M pH 7,5 durante 12 horas.

FOSFORILASE INATIVA DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

A inativação de fosforilase de levedura foi feita segundo STREHLAU et al. (1973).

Procedimento - Fosforilase de levedura dialisada durante 4 horas contra tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 foi incubada a 30°C com a fosforilase-fosfatase, na proporção de 20 mg de fosforilase para cada mg de fosfatase, nas seguintes condições: para cada ml de solução de fosforilase eram adicionados 0,25 ml de solução de fosfatase e 1 ml de tampão Tris 0,1M - EDTA 0,001M pH 7,5. A inativação ocorria em mais ou menos 4 horas, sendo retirada alíquotas em diferentes tempos para ensaio da atividade fosforilásica. Simultaneamente, foram realizados os controles para a fosforilase e para a fosfatase. Após a inativação, o material era precipitado lentamente pela adição de sulfato de amônio sólido e centrifugado a 27.000 x g por 15 minutos. O precipitado era dissolvido em tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M pH 6,5 e dialisado contra este mesmo tampão; esta solução final era usada como preparação de fosforilase inativa de levedura de cervejeiro.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Como critério de pureza das preparações das enzimas foram realizadas eletroforese em gel de poliacrilamida em concentra-ção de 5%, segundo o método de ORNSTEIN & DAVIS (1963), modificado por DAVIES et al. (1967).

IMUNOPRECIPITAÇÃO EM MEIO GELIFICADO

As técnicas de imunodifusão foram realizadas em gel de agar a 1% em meio isotônico pH 7,2 a 7,4 conforme o método de OUCHTERLONY (1958). As técnicas de eletroforese e imunoeletroforese foram feitas de acordo com GRABAR & WILLIAMS (1953) e modificado por SHEIDEGGER (1955), utilizando-se lâminas de vidro 25 x 75 mm, contendo 1 a 2 mm de espessura de agar a 1% em tampão veronal 0,05M pH 8,4 a 4°C, usando-se 5 mA por lâmina, durante 60 ou 90 minutos, de acordo com a enzima em estudo.

OUTROS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

As centrifugações foram realizadas em centrífuga Sorvall RC2 B (Ivan Sorvall, Inc., N.Y., USA) ou na centrífuga Ependorff 3.200. As determinações pH-métricas foram feitas em pH-metro Metrohn E-369 B. Para as técnicas de eletroforese ou imunoeletroforese, utilizou-se o aparelho Electrophoresis cabinet-mod. 20 e Electrophoresis Power Supply-mod. 21 (Arthur Thomas Co.).

RESULTADOS

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE DE BATATA

A fosforilase de batata foi extraída por precipitação com sulfato de amônio. A purificação da enzima através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose está demonstrada na Fig. 1, onde observamos que apenas o quarto pico de proteína apresenta atividade fosforilásica. A homogeneidade da preparação foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE b DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

A fosforilase b de músculo esquelético de coelho foi purificada, cristalizada e recristalizada por mais duas vezes, na presença de soluções neutras de AMP e EDTA. Como critério de pureza da enzima obtida, foi observada, microscopicamente, a existência de cristais da proteína. Também foi comprovada a homogeneidade da preparação da enzima através da eletroforese em gel de poliacrilamida 5%.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

A Fig. 2 mostra a cromatografia em coluna de resina DEAE-celulose da preparação da fosforilase de levedura de cervejeiro, após precipitação em sulfato de amônio a 60% de saturação, conforme descrito em Material e Métodos. Embora repetíssemos várias vezes essa purificação, não encontramos o mesmo resultado obtido por AIROLDI (1973). Essa autora descreveu

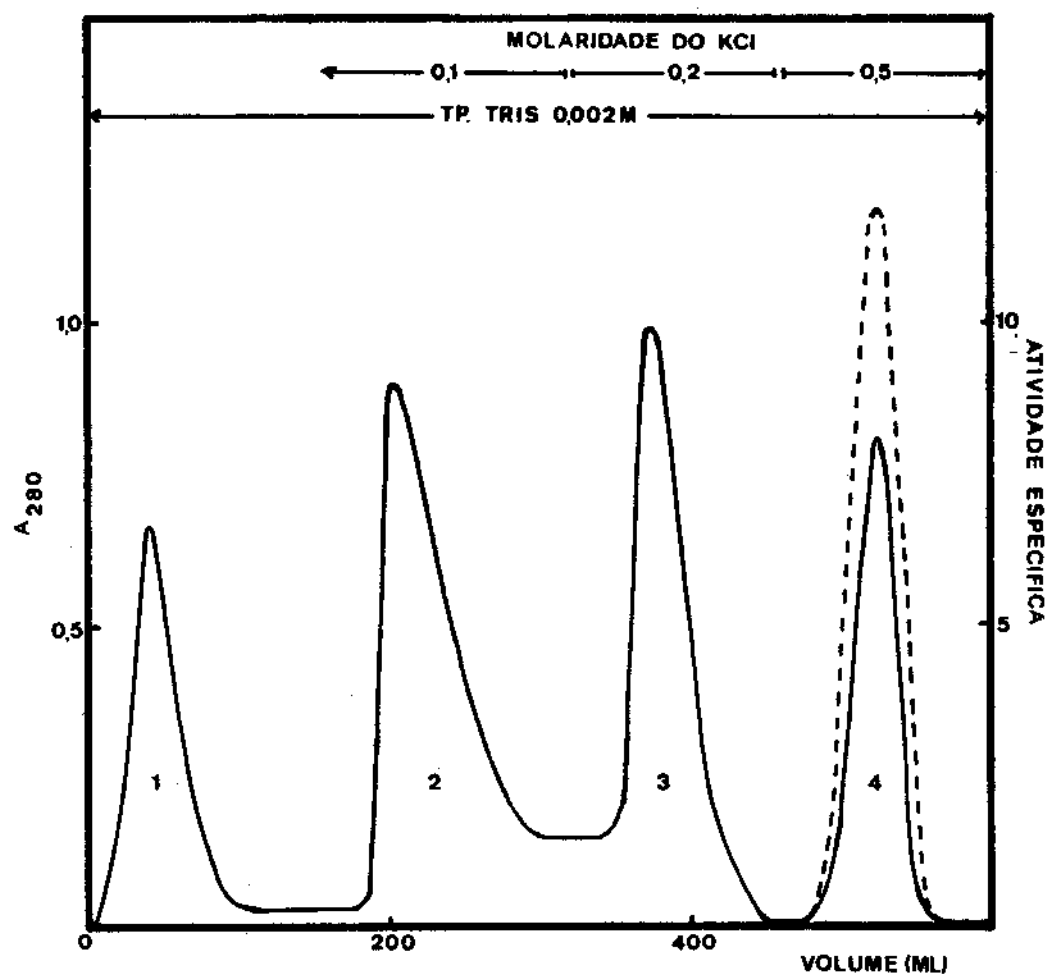


Fig. 1 - Cromatografia de fosforilase de batata em coluna de resina de DEAE-celulose (30 x 1,5 cm), após o segundo fracionamento com sulfato de amônio e diálise, conforme descrito em Material e Métodos. Eluições realizadas com a passagem sucessiva de tampão Tris 0,002M pH 7,5 e na presença de KCl 0,1M; 0,2M ou 0,5M. A_{280} corresponde a absorvância ($\lambda = 280$ nm) do eluato, representado por (—). Atividade específica é representada por (---) e expressa por u/mg de proteína.

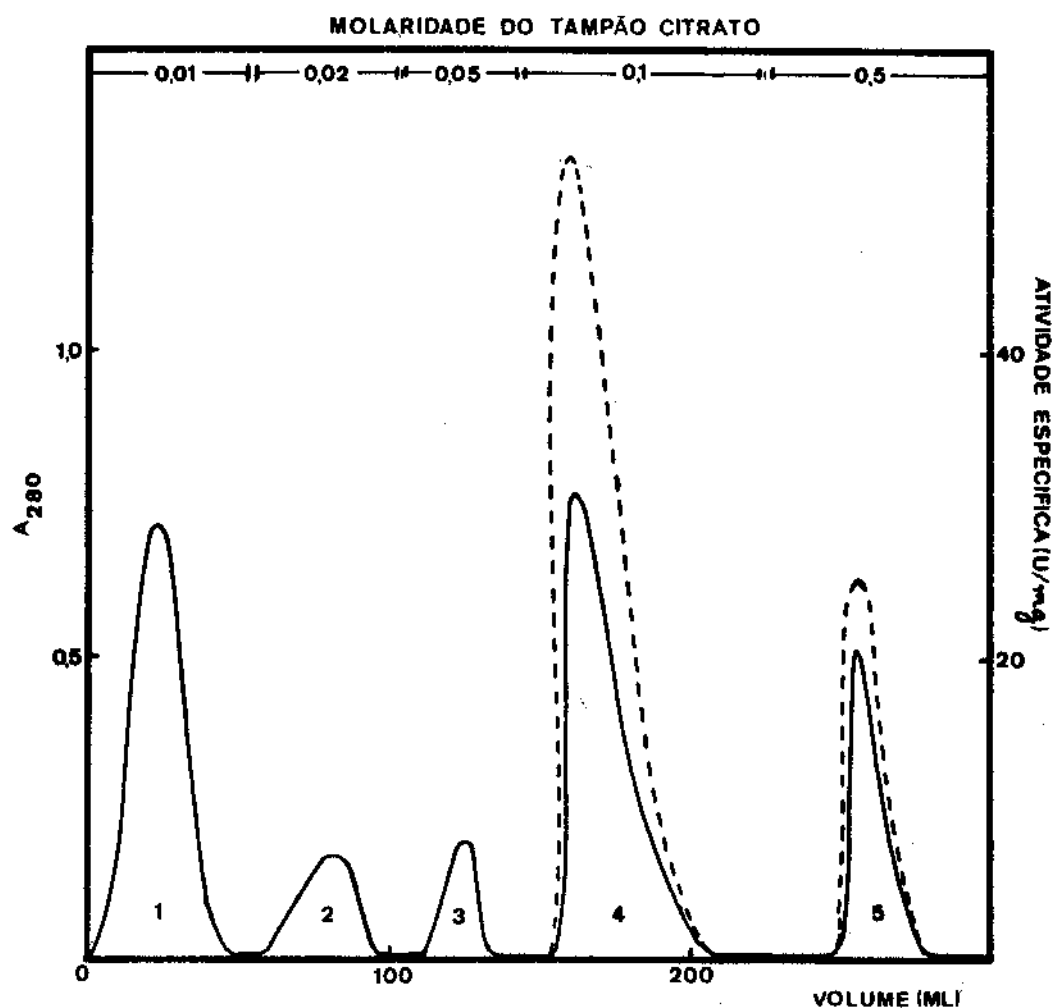


Fig. 2 - Cromatografia de fosforilase de levedura de cervejeiro em coluna de resina de DEAE-celulose (14x1,5 cm) após o fracionamento com sulfato de amônio, na concentração final de 60% de saturação do sal. Tampões eluentes de citrato - EDTA 0,001M, pH 6,5. Concentrações crescentes e gradativas de citrato 0,01M; 0,02M; 0,05M; 0,1M e 0,5M. A_{280} corresponde a absorvância ($\lambda = 280$ nm) do eluato, representado por (—). Atividade específica é representada por (---) e expressa por u/mg de proteína.

que a fosforilase de levedura era eluída da coluna de resina de DEAE-celulose, durante a passagem do tampão citrato 0,5M EDTA 0,001M pH 6,5, enquanto que nós obtivemos não só atividade fosforilásica nos eluatos da cromatografia, durante a passagem de tampão citrato 0,1M - EDTA 0,001M (pico 4), como também durante a passagem do tampão citrato 0,5M - EDTA 0,001M (pico 5). No nosso caso, o eluato correspondente ao pico 4 apresentou maior atividade específica e por isso, foi usado como fosforilase de levedura purificada nas experiências descritas neste trabalho.

OBTENÇÃO DA FOSFORILASE INATIVA DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

O processo de inativação da fosforilase de levedura de cervejeiro, catalisada pela fosforilase fosfatase de levedura de cervejeiro parcialmente purificada, está demonstrado na tabela II e na Fig. 3. A fosforilase fosfatase catalisou a inativação da fosforilase de levedura em 97,5% após 2 horas de reação. Após 4 horas de reação nenhuma atividade fosforilásica pode ser detectada. Dessa forma, as preparações de fosforilase inativa de levedura usadas neste trabalho, foram obtidas após 4 horas de ação da fosforilase fosfatase sobre a enzima ativa.

OBTENÇÃO DOS ANTI-SOROS

Preparação de soro anti-fosforilase de batata - O soro anti-fosforilase de batata foi obtido em coelho adulto (em média de 3 kg), inoculando-se 0,5 mg da enzima emulsionada com adjuvante completo de Freund, em partes iguais (v/v) nos linfonodos das patas traseiras. Após duas semanas da primeira inoculação foi feita uma segunda inoculação em condições idênti

TABELA II

Inativação da fosforilase de levedura de cervejeiro na presença ou ausência da fosforilase fosfatase de levedura de cervejeiro. Temperatura 30°C. u/ml representa a quantidade de unidades absolutas de atividade fosforilásica por ml da solução de enzima.

TEMPO (horas)	Fosf. de Levedura com Fosf. Fosfatase u/ml	Fosf. de Levedura sem Fosf. Fosfatase u/ml
0	320,0	320,0
1	28,0	160,0
2	8,0	144,0
3	1,6	124,0
4	0,0	120,0

cas. Duas semanas após a segunda inoculação, foi injetado intravenosamente uma série de doses crescentes em dias alternados, perfazendo um total de seis doses de concentrações de proteína que variaram, progressivamente, de 0,5 mg na primeira até 1,5 mg na última dose. Os animais foram sangrados por punção cardíaca e os soros foram separados por centrifugação e conservados a -20°C, em congelador.

Preparação de soro anti-fosforilase inativa de levedura - Este antissoro foi preparado em coelho, inoculando-se nos linfonodos 1 ml de uma mistura contendo partes iguais de fosforilase inativa de levedura (5,0 mg de proteína) e adjuvante completo de Freund. Decorridas quatro semanas após a primeira dose, mais duas inoculações foram feitas, nas mesmas condições anteriores, com intervalo de duas semanas entre uma e

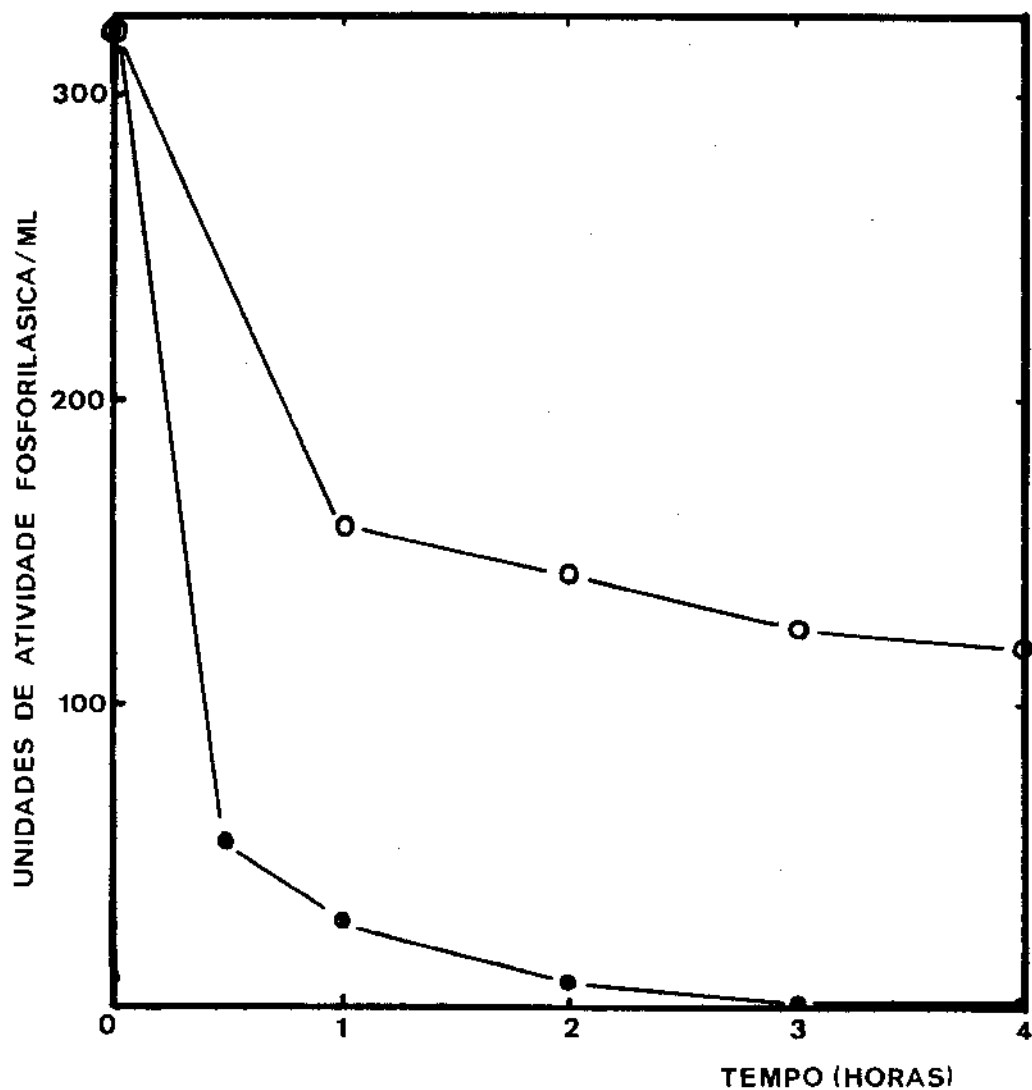


Fig. 3 - Inativação da fosforilase de levedura de cervejeiro na presença (●—●) ou ausência (○—○) de fosforilase fosfatase. Temperatura = 30°C. Preparações das enzimas conforme descrito em Material e Métodos.

outra. Após cinco semanas da última inoculação, os animais foram novamente injetados com uma dose de reforço. Depois de uma semana, os animais foram sangrados, e os soros eram separados por centrifugação e armazenados a -20°C .

ESPECIFICIDADE DOS ANTISSOROS

Experiências de imunodifusão em gel de agar e imunoeletroforese, foram realizadas a fim de verificar a especificidade imunológica dos soros anti-fosforilase de batata e anti-fosforilase inativa de levedura.

Nos testes de imunodifusão em gel de agar observou-se a formação de apenas uma linha de precipitação nas reações entre a fosforilase de batata e seu antissoro (Fig. 4).

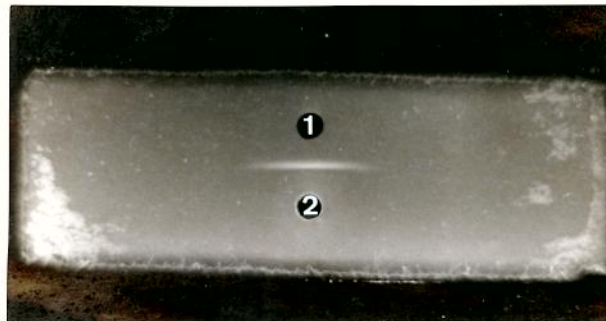


Fig. 4 - Imunodifusão em gel de agar de fosforilase de batata (1), contra o soro anti-fosforilase de batata (2).

Em experiências de imunoeletroforese utilizando soro anti-fosforilase de batata, verificou-se uma única linha de precipitação nas reações entre a fosforilase de batata e seu antissoro específico (Fig. 5).



Fig. 5 - Imunoeletroforese em gel de agar de fosforilase de batata. Enzima purificada até a fase do segundo fracionamento com sulfato de amônio (1); enzima purificada após cromatografia em DEAE-celulose (2); contra soro de coelho anti-fosforilase de batata (S).

As experiências de imunodifusão usando o soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura, revelaram apenas uma linha de precipitação entre a enzima e seu antissoro (Fig. 6).

A análise de imunoeletroforese revelou uma única linha de precipitação entre a fosforilase inativa de levedura e seu antissoro, conforme Fig. 7.



Fig. 6 - Imunodifusão em gel de agar de fosforilase inativa de levedura (1), contra o soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura (2).



Fig. 7 - Imunoeletroforese de fosforilase inativa de levedura (1) contra o soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura (S).

ESTUDOS IMUNOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE FOSFORILASE DE BATA-
TA, FOSFORILASE b DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO E FOSFORI-
LASE ATIVA E INATIVA DE LEVEDURA DE CERVEJEIRO

Várias reações imunológicas foram feitas a fim de verificar possíveis reações cruzadas entre as diferentes enzimas em estudo. Na reação antígeno-anticorpo por precipitação em gel de agar usando o soro anti-fosforilase de batata e os antígenos: fosforilase de batata, fosforilase b de músculo e fosforilase de levedura, obtivemos uma única linha de precipitação correspondente a fosforilase de batata, enquanto que os outros antígenos não precipitaram, conforme demonstramos na Fig. 8.

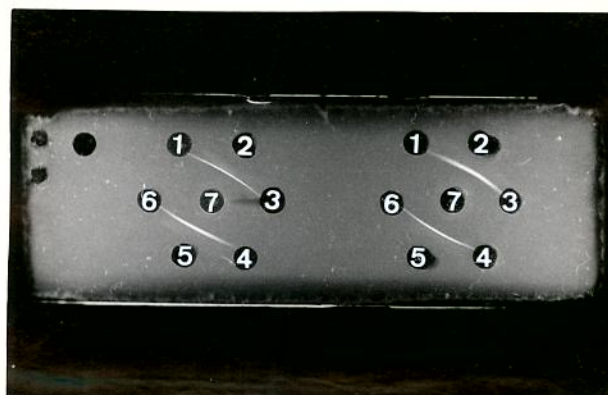


Fig. 8 - Imunodifusão em gel de agar de fosforilase ativa de levedura (1 e 4); fosforilase de batata (2 e 5); fosforilase b de músculo esquelético de coelho (3 e 6); contra soro de coelho anti-fosforilase de batata (7). Concentração de antígeno 0,5 mg/ml.

Testes de dupla difusão em agar, usando-se soro anti-fosforilase inativa de levedura contra a fosforilase b de músculo, a de batata e a fosforilase inativa de levedura estão demonstrados na Fig. 9, onde observamos reação de precipitação antígeno-anticorpo apenas com fosforilase inativa de levedura e nenhuma reação cruzada com as outras enzimas.

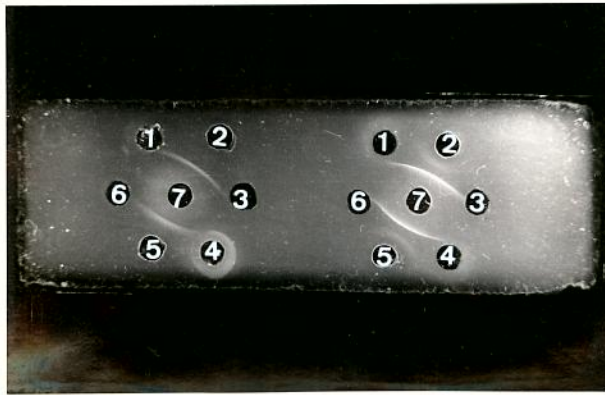


Fig. 9 - Imunodifusão em gel de agar de fosforilase b de músculo esquelético de coelho (1 e 4); de fosforilase inativa de levedura (2 e 5); e de fosforilase de batata (3 e 6), contra soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura (7). A concentração dos antígenos, em todos os casos, foi de 0,5 mg de proteína/ml.

Por outro lado, foi evidenciada reação de identidade imunológica entre as fosforilases ativa e inativa de levedura de cervejeiro quando ambas enzimas eram testadas contra soro anti-fosforilase inativa de levedura, conforme mostramos na Fig. 10.

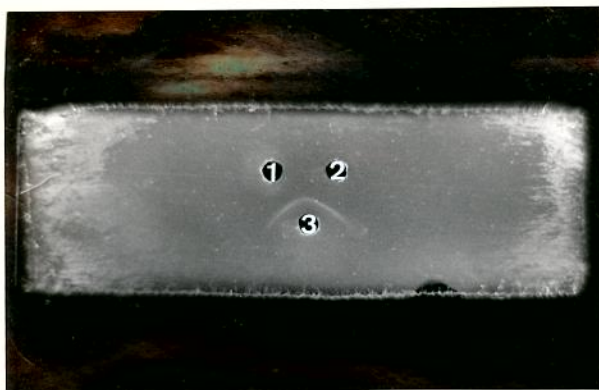


Fig. 10 - Imunodifusão de fosforilase ativa de levedura (1); e da inativa (2); contra o soro de coelho anti-fosforilase i nativa de levedura de cervejeiro (3).

Os resultados que apresentamos nas Figuras 11, 12, 13 e 14, confirmam os achados anteriores demonstrando a ausência de relações antigênicas entre as fosforilases em estudo, porem as fosforilases ativa e inativa de levedura apresentam reação de identidade imunológica entre si.



Fig. 11 - Imunodifusão de fosforilase de batata (1); de fosforilase ativa de levedura (2); de fosforilase inativa de levedura (3); fosforilase b de músculo esquelético de coelho (4); contra o soro de coelho anti-fosforilase de batata (5) ou contra o soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura (6).



Fig. 12 - Imunodifusão de fosforilase inativa de levedura (1 e 4); de fosforilase de batata (2 e 5); de fosforilase b de músculo esquelético de coelho (3 e 6); e de fosforilase ati-va de levedura (7 e 8); contra uma mistura, em partes iguais de soros de coelho anti-fosforilase de batata e o de anti-fosforilase inativa de levedura (9).

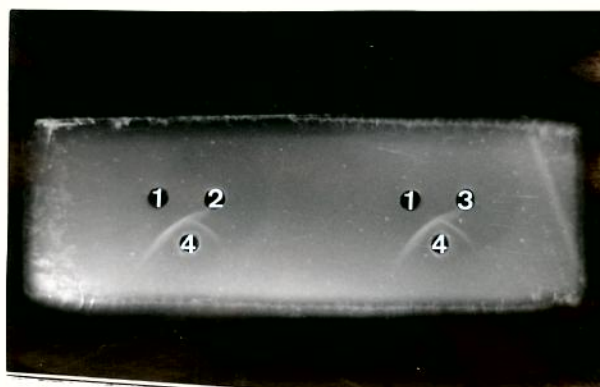


Fig. 13 - Dupla difusão em gel de agar de fosforilase de batata (1); de fosforilase ativa de levedura (2); e de fosforilase inativa de levedura (3); contra uma mistura, em partes iguais, de soros de coelho anti-fosforilase de batata e de anti-fosforilase inativa de levedura (4).

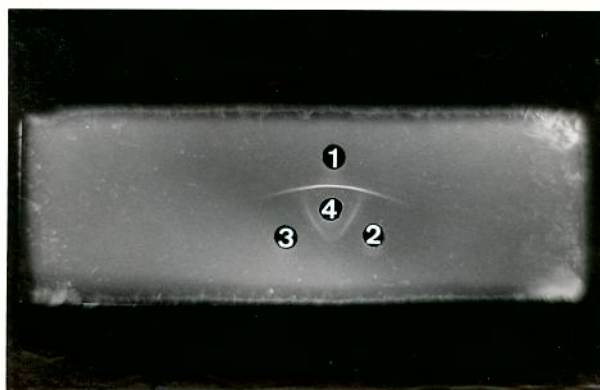


Fig. 14 ~ Imunodifusão de fosforilase de batata (1); de fosforilase ativa de levedura (2); e de fosforilase inativa de levedura (3); contra soros de coelho anti-fosforilase inativa de levedura e o de anti-fosforilase de batata, misturados em partes iguais (4).

Experiências de imunoeletroforese de fosforilase ativa e inativa de levedura na presença de soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura demonstraram que as duas formas da enzima apresentam arcos de precipitação bastante equivalentes entre si, como demonstramos na Fig. 15.

Por outro lado, estudos comparativos entre as duas formas de fosforilase de levedura e de fosforilase de batata, através de experiências de imunoeletroforese demonstradas nas Figuras 16 e 17, revelaram que essas enzimas apresentam mobilidades eletroforéticas distintas.

No sentido de compararmos o comportamento imunológico da fosforilase de levedura de cervejeiro com a fosforilase de levedura de padeiro, visto que ambas leveduras são raças diferentes de Saccharomyces cerevisiae, experiências de imuno-difusão foram realizadas.

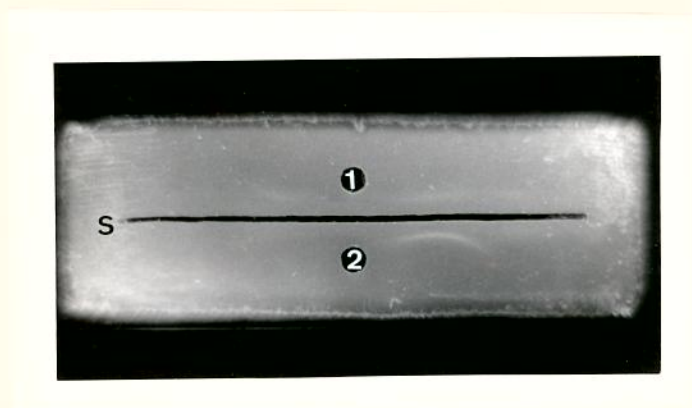


Fig. 15 - Imunoeletroforese de fosforilase ativa (1) e da inativa (2) de levedura frente ao soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura (S).



Fig. 16 - Imunoeletroforese de fosforilase ativa de levedura (1) e de fosforilase de batata (2), contra uma mistura de soros de coelho anti-fosforilase inativa de levedura e anti-fosforilase de batata em partes iguais (S)



Fig. 17 - Imunoeletroforese de fosforilase inativa de levedura (1) e de fosforilase de batata (2), frente aos soros de coelho anti-fosforilase inativa de levedura e o anti-fosforilase de batata misturados em partes iguais (S)

Na Fig. 18 mostramos que tanto a fosforilase ativa ou inativa de levedura de cervejeiro como a fosforilase de levedura de padeiro, apresentaram idêntico comportamento imunológico, quando testadas contra soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura de cervejeiro.

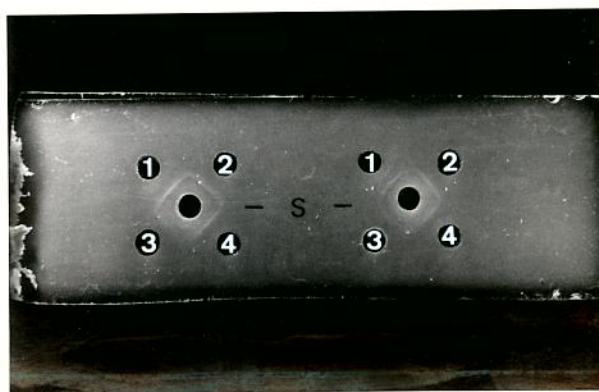


Fig. 18 - Imunodifusão de fosforilase inativa de levedura de cervejeiro 0,5 mg/ml (1); de fosforilase ativa de levedura de padeiro 8 mg/ml (2) e 4 mg/ml (3); de fosforilase ativa de levedura de cervejeiro 2 mg/ml (4); contra soro de coelho anti-fosforilase inativa de levedura de cervejeiro.

A tabela III representa os resultados de estudos imunológicos comparativos entre fosforilases de origens diferentes e entre as formas ativa e inativa da fosforilase de levedura de cervejeiro.

TABELA III

Relações antigênicas entre a fosforilase de batata, a fosforilase b de músculo esquelético de coelho, as fosforilases a e b de levedura de cervejeiro e a fosforilase de levedura de padeiro

Enzimas Antissoro	Fosforilase <u>b</u> de músculo esquelé- tico de coelho	Fosforilase de batata	Fosforilase de levedura de cervejeiro		Extrato bruto de fosforila- se de levedu- ra de padeiro
			forma ativa	forma inativa	
Soro de coelho anti-fosforila- se de batata	-	+	-	-	-
Soro de coelho anti-fosforila- se inativa de levedura de cervejeiro	-	-	+	+	+

DISCUSSÃO

Por analogia com as fosforilases de músculo esquelético, pode-se denominar de fosforilase b de levedura de cervejeiro a forma inativa e de fosforilase a, a forma ativa.

Os antissoros obtidos pela imunização de coelho com as fosforilases de batata e a fosforilase b de levedura de cervejeiro, quando examinadas pelas técnicas de imunodifusão e imuno eletroforese, mostraram ser específicos para cada enzima inoculada. A técnica de imunização usada preferencialmente foi a da inoculação feita diretamente nos linfonodos (região ganglionar). Este método permitiu a obtenção de antissoros mono-específicos com concentrações de proteínas relativamente baixas, inoculando-se preparações enzimáticas com apenas 0,5 mg de proteína por ml, como foi o caso da fosforilase de batata.

O estudo das relações antigênicas entre a fosforilase de batata, a fosforilase b de músculo e a fosforilase a de levedura de cervejeiro, utilizando-se o soro de coelho anti-fosforilase de batata não evidenciou a existência de reações cruzadas entre essas enzimas, durante experiências de imunodifusão e imuno eletroforese. O mesmo resultado foi obtido quando usamos o soro anti-fosforilase b de levedura contra aquelas enzimas. Quanto foi usada uma mistura dos soros anti-fosforilase de batata e o anti-fosforilase b de levedura frente a fosforilase de batata, a fosforilase b de músculo e a fosforilase a ou b de levedura, confirmou-se mais uma vez, a ausência de reação cruzada entre o sistema de fosforilases de distintas origens. Esses achados indicam que a maioria dos determinantes antigênicos das fosforilases utilizadas são diferentes entre si e que essas enzimas devem apresentar estrutura antigênica diferente, visto que, não foi possível a ve-

rificação de nenhuma reação de identidade imunológica através das técnicas usadas neste trabalho.

A conversão de fosforilase b para fosforilase a, catalisada por fosforilase b quinase em presença de ATP e Mg^{2+} , foi descrita para sistemas de fosforilases de várias origens. No caso das fosforilases de levedura de cervejeiro foi descrito a ação de um fator ativante que promoveria a conversão de fosforilase b em fosforilase a (AIROLDI, 1973). Esse fator ativante provavelmente corresponda a uma proteína quinase visto que a presença dessa enzima já foi demonstrada para a fosforilase de levedura de padeiro (FOSSET et al., 1971). Durante esse processo a proteína inativa sofre uma alteração na sua estrutura primária, através da fosforilação do resíduo de serina, e provavelmente, também modificações na estrutura espacial, tornando-a ativa.

A conversão de fosforilase a para fosforilase b catalisada pela fosforilase-fosfatase, também foi descrita para sistemas de fosforilases de várias origens, inclusive para o de levedura de cervejeiro (STREHLAU et al., 1973). Essa reação causa uma modificação covalente da enzima ativa, pela hidrólise do grupamento serina-fosfato.

Através de experiências de imunodifusão e imunoeletroforese, demonstramos que as fosforilases a e b de levedura de cervejeiro apresentaram reação de identidade imunológica, quando essas enzimas eram testadas contra soro de coelho anti-fosforilase b de levedura. Este fato pode sugerir que o resíduo de serina-fosforilada ou de serina desfosforilada, importantes na interconversão das formas ativa e inativa e vice-versa, não estejam envolvidos na estrutura dos determinantes antígenicos das enzimas. Verificamos, portanto, que através do estudo imunoquímico comparativo, as fosforilases a e b de le

vedura de cervejeiro não apresentaram alterações de estrutura antigênica detectáveis, nas nossas experiências realizadas.

Os nossos resultados são bastante concordantes com os já descritos na literatura. Assim, as fosforilases de músculo esquelético de coelho apresentaram identidade imunológica entre as suas duas formas, a e b (YUNIS & KREBS, 1962) e o mesmo foi demonstrado para as fosforilases a e b de levedura de padeiro (FOSSET et al., 1971). Os nossos achados sobre a não identidade imunológica entre fosforilases de músculo esquelético de coelho (origem animal), a de batata (origem vegetal) e a levedura de cervejeiro (protista), também concordam com os dados descritos na literatura sobre estudos realizados com fosforilases de origens diferentes. Do mesmo modo, o fato das fosforilases de levedura de cervejeiro possuir identidade imunológica com a de padeiro, demonstrada neste trabalho, também está coerente com a hipótese de que fosforilase de mesma origem ou de um mesmo tecido possam apresentar identidade imunológica. No caso da levedura de cervejeiro e de padeiro, ambas raças de S.cerevisae, as fosforilases devem a apresentar diferenças químicas, físico-químicas, quanto ao mecanismo de regulação, cinéticas, etc., visto que a levedura de padeiro exige uma maior aeração de oxigênio para seu crescimento do que a de cervejeiro.

Contudo, mesmo existindo tais diferenças, as fosforilases de levedura das duas raças parecem possuir identidade imunológica.

RESUMO

Estudos comparativos de imunodifusão e imunoeletroforese foram realizados com fosforilases (E.C.2.4.1.1.) b de músculo esquelético de coelho (animal), de batata (vegetal), a e b de levedura de cervejeiro e a de levedura de padeiro.

Usando-se soro de coelho anti-fosforilase de batata, não foi possível detectar reação de precipitação antígeno-anticorpo com fosforilase de levedura ou de músculo esquelético de coelho. Usando-se soro de coelho anti-fosforilase b de levedura de cervejeiro, também não foi possível detectar reação de precipitação antígeno-anticorpo com fosforilases de batata ou de músculo esquelético. Esses achados apoiam a hipótese de que fosforilases de origens distintas ou de tecidos distintos não devem apresentar estrutura antigênica idêntica.

Foi demonstrado que há identidade imunológica entre fosforilase a e b de levedura de cervejeiro, confirmando observações de outros autores sobre identidade imunológica entre a forma ativa e a inativa da fosforilase de músculo esquelético, bem como as de levedura de padeiro. Esse fato sugere que o resíduo seril-fosfato, importante para os mecanismos de ativação-inativação e o de associação-dissociação da enzima, não influa diretamente na estrutura antigênica das fosforilases, bem como, que a polimerização da enzima, causando alterações na estrutura quaternária da proteína, não cause significativas alterações na estrutura antigênica das enzimas.

Foi também demonstrado que, embora os sistemas de fosforilases de levedura de cervejeiro e a de padeiro (ambas leveduras são raças de Saccharomyces cerevisiae), apresentem significativas diferenças físico-químicas de peso molecular, quan

to ao mecanismo regulatório, cinéticas, etc., as fosforilases devem possuir identidade imunológica entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, L. P. S. (1973). Purificação e propriedades de fosforilase de levedura de cervejeiro. Tese de Doutorado, UNICAMP.
- BARANOWSKI, T.; ILLINGWORTH, B.; BROWN, D.H. and Cori, C.F. (1957). The isolation of pyridoxal 5'-phosphate from crystalline muscle phosphorylase. Biochim.Biophys.Acta, 25:16-21.
- BROWN, D.H. and CORI, C.F. (1961). Animal and plant polysaccharide phosphorylases. In: The Enzymes, edited by P.D.Boyer, H.Lardy and K.Myrback, New Yor, Academic Press vol. 5, pp 207.
- BUEDING, E.; KENT, N. and FISCHER, J. (1964). Tissue specificity by glycogen phosphorylase b of intestinal smooth muscle. J.Biol.Chem., 239:20099-20101.
- CORI, C.F. and CORI, G.T. (1937). The isolation and synthesis of glucose-1-phosphoric acid. J.Biol.Chem., 121,465-473.
- CORI, C.F.; CORI, G.T. and GREEN, A.A. (1943). Crystalline muscle phosphorylase. III. Kinetics. J.Biol.Chem., 151: 39-55.
- CORI, G.T.; COLOWICK, S.P. and CORI, C.F. (1938). The formation of glucose.1.phosphoric acid in extracts of mammalian tissues and of yeast. J.Biol.Che., 123:375-380.
- CORI, G.T. and CORI, C.F. (1945). The enzymatic conversion of phosphorylase a to b. J.Biol.Chem., 158:321-332.
- CORI, G.T.; ILLINGWORTH, B. and KELLER, P.J. (1955). Muscle phosphorylase. In: Methods in Enzymology, edited by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., New York, Academic Press, vol. I, pp. 200-205.
- DAVIES, C.H.; SCHLISELFELD, D.P.; WOLF, L.H.; LEAVITT, C.A. and KREBS, E.G. (1967). Interrelationships among glycogen phosphorylase isozymes. J.Biol.Chem., 242:4824-4833.

- DE VINCENZI, D.L. and HEDRICK, J.L. (1967). Re-evaluation of the molecular weights of glycogen phosphorylase a and b by using Sephadex gel filtration. Biochemistry, 6:3489-3497.
- DITTERBRANDT, M. (1948). Application of the weichselbaum biuret reagent to the determination of spinal fluid protein. Amer.J.Clin.Path., 18:439-441.
- FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. J.Biol.Chem., 216:121-132.
- FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. (1962). Muscle phosphorylase b. In: Methods in Enzymology, edited by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press, New York, vol. 5, pp 369-373.
- FISCHER, E.H.; APPLEMAN, M.M. and KREBS, E.G. (1964). The structure of phosphorylase. In: Control of glycogen metabolism, 94-103, Wheland, W.J. ed., Boston, Little Brown, (Ciba Foundation Symposium).
- FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. (1966). Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. Fed. Proc., 25:1511-1520.
- FOLIN, O. and CIOCALTEAU, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J.Biol.Chem., 73:627-650.
- FOSSET, M.; MUIR, L.W.; NIELSEN, L.D. and FISCHER, E.H. (1971). Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b. Biochemistry, 10:4105-4113.
- GONÇALVES, J.M. and FOCESI JR., A. (1967). Inhibition of skeletal muscle phosphorylase a and b by 1,2,4- α -dinitrophenol. Natl.Cancer Inst.Monograph., 27:71-80.
- GRABAR, P. and WILLIAMS, C.A. (1953). Method permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim.Biophys.Acta, 10:193.
- HENION, W.F. and SUTHERLAND, E.W. (1957). Immunological differences of phosphorylases. J.Biol.Chem., 224:477-488.
- ILLINGWORTH, B.; JANSZ, H.S.; BROWN, T.H. and CORI, C.F. (1958). Observations on the function of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 44:1180-1191.

- KAMOGAWA, A.; FUKUI, T. and NIKUNI, Z. (1968). Potato α -glucan phosphorylase: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. J.Biochem., 63:361-369.
- KELLER, P.J. and CORI, G.T. (1953). Enzymatic conversion of phosphorylase a to phosphorylase b. Biochim.Biophys. Acta, 12:235-238.
- KENT, A.B.; KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. (1958). Properties of crystalline phosphorylase b. J.Biol.Chem., 232:549-558.
- KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 20:150-157.
- LEE, Y.P. (1960a). Potato phosphorylase. I. Purification, physicochemical properties and catalytic activity. Biochemi.Biophys. Acta, 43:18-24.
- LEE, Y.P. (1960b). Potato phosphorylase. II. Phosphate and sulphydryl groups. Biochim.Biophys. Acta, 43:25-30.
- LOHMANN, K. and JENDRASSIK, L. (1926). Kolorimetrische phosphorsäurebestimmungen in muskelextrakt. Biochem.Z., 178:419-426.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275.
- MADSEN, N.B. and CORI, C.F. (1956). The interaction of muscle phosphorylase with p-chloromercuribenzoate. I. Inhibition of activity and effect on the molecular weight. J.Biol.Chem., 223:1055-1065.
- MADSEN, N.B. and CORI, C.F. (1957). The binding of adenilic acid by muscle phosphorylase. J.Biol.Chem., 224:899-908.
- MANNERS, D.J. and RYLEY, J.F. (1952). Studies on the metabolism of Protozoa 2. The glycogen of the ciliate Tetrahymena pyriformis (Glaucoma pyriformis). Biochem.J. 52:480.
- ORNSTEIN, L. and DAVIS, H.J. (1963). Disc.Electrophoresis. Distillation products. Rochester, New York.
- PFLUGER, E.F.W. (1904). Pflüger's Arch., 102:305.

- SATO, K. and WEINHOUSE, S. (1973). Purification and characterization of the Norikoff hepatoma glycogen phosphorylase and its relations to a fetal form. Arch.Biochem. Biophys., 159:151-159.
- SEERY, V.L.; FISCHER, E.H. and TELLER, D.C. (1967). A reinvestigation of the molecular weight of glycogen phosphorylase. Biochemistry, 6:3315-3327.
- SEKINO, T. (1974). Propriedades Físico-químicas da Fosforilase a de levedura de cervejeiro (*S.cereviseae*). Mecanismo de interconversão entre a Fosforilase a e Fosforilase b e comparação com outros sistemas de fosforilases. UNICAMP.
- SHEIDEGGER, J.J. (1955). Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int.Arch.Allergy, 7:103.
- STREHLAU, F.; AIRODLI, L.P.S. and FOCESSI JR., A. (1973). Polysaccharide phosphorylase of Brewer's yeast. II. Specificity of the phosphorylase phosphatase. IRCS Medical Science, (73-10) 3-7-23.
- ULLMANN, A.; GOLDBERG, M.E.; PERRIN, D. and MONOD, J. (1968) On the determination of molecular weight of proteins and protein sub units in the presence of 6M guanidine hydrochloride. Biochemistry, 7:261-265.
- WEICHSELBAUM, T.E. (1946). An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Amer.J.Clin.Path.Tech.Suppl., 10:40-49.
- YUNIS, A.A.; FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. (1962). Comparative studies on glycogen phosphorylase. IV. Purification and properties of rabbit heart phosphorylase. J.Biol.Chem., 237:2809-2815.
- YUNIS, A.A. and KREBS, E.G. (1962). Comparative studies on glycogen phosphorylase. J.Biol.Chem., 237:34-39.
- YUNIS, A.A. and ASSAF, S.A. (1970). Purification and properties of glycogen phosphorylase from bovine corpus luteum. Kinetics of salt activation. Biochemistry, 9: 4381-4388.